

ВЕСТНИК РГМУ

МАЙ-ИЮНЬ 2016 (3) ISSN 2070-7320

VESTNIKRGMU.RU



РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА **ОБЗОР**

МЕТОД Система CRISPR/Cas9 16

Модификация метода анализа результатов редактирования генома

СТАТЬЯ Бронхиальная астма у детей 43

Некоторые генотипы полиморфизмов *rs11362* и *rs1799946* ассоциированы с заболеванием

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Научный медицинский журнал Российского национального
исследовательского медицинского университета
имени Н. И. Пирогова

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Scientific Medical Journal of Pirogov National
Research Medical University

Главный редактор

Editor-in-chief

Денис Ребриков, д. б. н.

Denis Rebrikov, DSc

Заместитель главного редактора

Deputy editor-in-chief

Александр Эттингер, д. м. н.

Alexander Oettinger, DSc

Руководитель редакции

Editorial manager

Елена Куликова

Elena Kulikova

Редакторы

Editors

Лилия Егорова

Liliya Egorova

Дмитрий Зубаков, к. б. н.

Dmitry Zubakov, CSc

Екатерина Брюшкова, PhD

Ekaterina Bryushkova, PhD

Айарпи Ездоглян

Ayarpi Ezdoglyan

Корректор

Proof-reader

Ольга Комар

Olga Komar

Переводчики

Translators

Екатерина Третьякова

Ekaterina Tretiayakova

Энтони Нвохири, к. т. н.

Anthony Nwohiri, PhD

Дизайн и верстка

Design and layout

Марина Доронина

Marina Doronina

Журнал входит в Перечень ведущих научных
журналов и изданий ВАК.

Журнал доступен в Google Scholar.

IF РИНЦ 2014: 0,134.

Номер подписан в печать 30.06.2016

Адрес редакции: 117997, г. Москва,
ул. Островитянова, д. 1.

Для подачи публикаций: editor@vestnikrgmu.ru

По вопросам сотрудничества: manager@vestnikrgmu.ru

Редакционная коллегия

Editorial board

Г. П. Арутюнов, д. м. н.

G. P. Arutyunov, DSc

Ю. В. Балякин, д. м. н.

Yu. V. Balyakin, DSc

М. Р. Богомилский*, д. м. н.

M. R. Bogomilskiy, DSc

Л. В. Ганковская, д. м. н.

L. V. Gankovskaya, DSc

Ю. Э. Доброхотова, д. м. н.

Yu. E. Dobrokhotova, DSc

Л. И. Ильенко, д. м. н.

L. I. Ilyenko, DSc

О. А. Кисляк, д. м. н.

O. A. Kislyak, DSc

В. И. Лапочкин, д. м. н.

V. I. Lapochkin, DSc

А. В. Матюшкин, д. м. н.

A. V. Matyushkin, DSc

А. Г. Пашинян, д. м. н.

A. G. Pashinyan, DSc

* член-корреспондент РАН

corresponding member of RAS

Редакционный совет

Editorial council

Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н.

E. I. Gusev, member of RAS, DSc

И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н.

I. I. Zatevakhin, member of RAS, DSc

Ю. Ф. Исаков, академик РАН, д. м. н.

Yu. F. Isakov, member of RAS, DSc

Ю. М. Лопухин, академик РАН, д. м. н.

Yu. M. Lopukhin, member of RAS, DSc

С. Б. Петерсон, д. м. н.

S. B. Peterson, DSc

Н. В. Полунина*, д. м. н.

N. V. Polunina, DSc

Б. А. Поляев, д. м. н.

B. A. Polyayev, DSc

Г. В. Порядин*, д. м. н.

G. V. Poryadin, DSc

Н. Г. Потешкина, д. м. н.

N. G. Poteshkina, DSc

С. В. Свиридов, д. м. н.

S. V. Sviridov, DSc

А. В. Скороглядов, д. м. н.

A. V. Skoroglyadov, DSc

В. А. Стаханов, д. м. н.

V. A. Stakhanov, DSc

Е. В. Старых, д. м. н.

E. V. Starykh, DSc

И. З. Шишков, д. ф. н.

I. Z. Shishkov, DSc

Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н.

G. M. Savelyeva, member of RAS, DSc

Ю. К. Скрипкин, академик РАН, д. м. н.

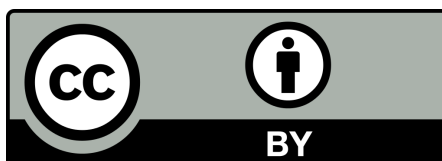
Yu. K. Skripkin, member of RAS, DSc

В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н.

V. I. Starodubov, member of RAS, DSc

А. И. Федин, д. м. н.

A. I. Fedin, DSc



Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International

www.creativecommons.org

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Подписной индекс по каталогу «Роспечать»: 46826

Отпечатано в типографии «ПРЕМИУМ ПРИНТ»

www.premium-print.ru

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОР	Редактирование генома человека Д. В. Ребриков Human genome editing Rebrikov DV	4
МЕТОД	Модификация метода анализа результатов редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9 на предимплантационных эмбрионах мыши Т. В. Дмитриева, Д. А. Решетов, В. Е. Жерновков, Д. В. Влодавец, Е. Д. Зотова, Т. Г. Ермолкевич, А. В. Дейкин Modification of the method for analysis of genome editing results using CRISPR/Cas9 system on preimplantation mouse embryos Dimitrieva TV, Reshetov DA, Zhernovkov VE, Vlodavets DV, Zotova ED, Ermolkevich TG, Deykin AV	16
СТАТЬЯ	Анализ фенотипических проявлений делеций в гене дистрофина в контексте эффективности пропуска экзонов как метода терапии наследственных дистрофинопатий Е. Д. Зотова, Д. А. Решетов, В. Е. Жерновков, Д. В. Влодавец, Т. В. Дмитриева, А. В. Дейкин Analysis of phenotype expressions of deletions in the dystrophin gene in terms of efficiency of exon skipping as a method for treatment of hereditary dystrophinopathies Zotova ED, Reshetov DA, Zhernovkov VE, Vlodovets DV, Dimitrieva TV, Deykin AV	23
МЕТОД	Мицеллярные композиции на основе функционализированных α-фетопротеином амфифильных блок-сополимеров, содержащих гадолиний и куркумин Н. В. Позднякова, Е. Ю. Григорьева, А. Б. Шевелев Gadolinium- and curcumin-loaded micelles based on α-fetoprotein functionalized amphiphilic block copolymers Pozdniakova NV, Grigorieva EYu, Shevelev AB	30
СТАТЬЯ	Иммуномодулятор «Имунофан» влияет на клеточный состав морфофункциональных зон тимуса крыс и замедляет его возрастную инволюцию И. В. Бобрышева Immunomodulator Imunofan affects cell profile of morphofunctional zones of rat thymus and delays its age-related involution Bobrysheva IV	38
СТАТЬЯ	Анализ экспрессии генов TLRs и ассоциации полиморфизмов гена <i>DEFB1</i> у детей с бронхиальной астмой М. А. Зайцева, Б. Г. Брагвадзе, О. А. Свитич, Л. С. Намазова-Баранова, Л. В. Ганковская Analysis of TLR gene expression and DEFB1 polymorphisms association in children with bronchial asthma Zaitseva MA, Bragvadze BG, Svitich OA, Namazova-Baranova LS, Gankovskaya LV	43
СТАТЬЯ	Ошибки диагностики и особенности лечения переломов костей стопы при сочетанной и множественной травме М. А. Королёв, Д. О. Ярмак, Е. А. Мирошникова, Ж. М. Молдакулов, А. В. Скорогляднов, Г. В. Коробушкин Diagnostic errors and management of foot fractures in patients with multiple or concomitant injuries Korolev MA, Yarmak DO, Miroshnikova CA, Moldakulov JM, Skoroglyadov AV, Korobushkin GV	48

СТАТЬЯ	Исследование микроциркуляции крови у детей 8 и 10 лет с использованием дыхательной пробы Н. В. Бабошина Evaluation of microcirculation in children of 8 and 10 years of age using inspiratory breath hold Baboshina NV	56
СТАТЬЯ	Гигиеническая оценка влияния организации образовательного процесса на физическое развитие школьников г. Москвы Н. А. Бокарева, О. Ю. Милушкина, Э. А. Овчинникова, Ю. П. Пивоваров, Н. И. Шеина Impact of learning environments on the physical development of Moscow schoolchildren: hygiene aspects Bokareva NA, Milushkina OYu, Ovchinnikova ZA, Pivovarov YuP, Sheina NI	63
СТАТЬЯ	Компетентность сообщества медицинского вуза в вопросах рисков и последствий татуирования кожи по результатам онлайн-анкетирования Е. В. Трушина, О. В. Минкина, А. С. Дворников, П. А. Скрипкина, Е. И. фон Цимфер, Я. И. Конышев How aware are members of the medical university community of the risks and consequences of skin tattooing? Results of the online survey Trushina EV, Minkina OV, Dvornikov AS, Skripkina PA, fon Zimfer EI, Konyshev Yal	70

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Д. В. Ребриков^{1,2,3} ✉¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва² Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва³ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

Быстро развивающиеся технологии редактирования генома из научно-исследовательских лабораторий уверенно переходят в клиническую практику. Разработаны принципиально новые методы изменения генома человеческих эмбрионов на ранних стадиях развития. Создан инструментарий для исправления генетических нарушений у людей в любом возрасте. Врач, по сути, становится корректором генетической инструкции по построению и функционированию организма человека. В обзоре обобщены сведения о современном состоянии технологий редактирования генома и существующих подходах к их использованию в клинической практике.

Ключевые слова: редактирование генома, генотерапия, наследственные заболевания, онкология, ВИЧ

✉ Для корреспонденции: Денис Владимирович Ребриков
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; drebrikov@gmail.com

Статья получена: 23.06.2016 Статья принята в печать: 25.06.2016

HUMAN GENOME EDITING

Rebrikov DV^{1,2,3} ✉¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² Kulakov Federal Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia³ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The rapidly evolving genome editing techniques are steadily moving from research laboratories to clinical practice. Fundamentally new methods of editing the genome of human embryos in the early stages of development have been developed. Tools for correction of genetic disorders in people of any age have also been created. In fact, the doctor is becoming a corrector of genetic instructions on construction and functioning of the human body. This review generalizes the data on the current state of genome editing techniques and existing approaches to applying them in clinical practice.

Keywords: genome editing, gene therapy, hereditary diseases, oncology, HIV

Correspondence should be addressed: Denis Rebrikov
ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; drebrikov@gmail.com

Received: 23.06.2016 Accepted: 25.06.2016

Изменение геномов живых организмов происходит постоянно, определяя ход их эволюции. Человек стал вмешиваться в этот процесс тысячи лет назад, отбирая успешно культивируемые растения и выводя породы домашних животных. Генная инженерия, возникшая немногим более полувека назад, позволила создавать трансгенные организмы: переносить гены между геномами или манипулировать ими внутри одного генома. Идея использования привносимой извне ДНК для лечения наследственных заболеваний человека возникла в начале 1970-х гг. [1]. В 1980-х гг. благодаря усовершенствованию методов работы с генами и созданию эукариотических векторов появилась реальная возможность коррекции генетического материала человека в терапевтических целях, однако сообщение о первом успешном результате было опубликовано лишь в 1990 г. [2]. В том же году исследователи использовали ретровирус для доставки работающего гена аденозиндеаминазы в клетки четырёхлетней и девятилетней пациенток с тяжёлым комбинированным иммунодефицитом. А уже с 1993 г. исследователи стали на регулярной основе применять генную терапию новорожденных с дефицитом аденозиндеаминазы (путем введения гена ADA в недифференцированные клетки пуповинной крови).

Мы живем в эру геномики, и все чаще в литературе можно встретить термин «геномная терапия». Пожалуй, следует уточнить использование терминов «генная терапия» (генотерапия) и «геномная терапия». Поскольку терминологические вопросы не являются принципиальными, можно либо считать эти термины равнозначными, либо принять «геномную терапию» в качестве варианта «генной терапии», при котором изменяется именно ядерный геном (хромосомная ДНК). Дело в том, что генная терапия может и не затрагивать хромосому: доставленный ген может работать как экстрахромосомный элемент (плазмида) или быть доставлен в виде матричной РНК (мРНК), кроме того, может быть модифицирована митохондриальная ДНК.

С 1989 по 2016 г. в мире было выполнено более 2300 клинических исследований генотерапевтических препаратов [3]. К настоящему моменту существуют более или менее эффективные подходы к генной терапии свыше 50 генетически детерминированных заболеваний человека: первичных комбинированных иммунодефицитов [4], гемофилии [5, 6], гемоглобинопатий [7–13], кистозного фиброза [14, 15], ахроматопсии [16], амавроза Лебера [17–19], эпилепсии [20], остеоартрита [21, 22], болезни Паркинсона [23–25], онкологических заболеваний [26–32].

В последние несколько лет с появлением качественно новых технологий направленного изменения генома (ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9) число заявок на начало клинических исследований генотерапевтических препаратов растет лавинообразно. Благодаря простоте и точности новых методов внесения изменений в геномную ДНК эукариотических клеток даже возник новый термин — редактирование генома (ведь в будущем мы, возможно, будем использовать изменение ДНК не только в терапевтических целях, но и для более праздных задач).

В качестве основных направлений применения геномной терапии можно выделить следующие: лечение наследственных (как правило, моногенных) заболеваний, лечение заболеваний, вызванных соматическими мутациями (в основном онкологических), и попытки лечения ВИЧ-инфекции путем уничтожения встроившихся в геном копий вируса или генов рецепторов, позволяющих вирусу проникнуть в клетку. Геномная терапия — это один из вариантов персонализированной медицины, когда используемый подход индивидуально подбирается к заболеванию (а иногда даже и к геному) пациента.

Федеральный закон Российской Федерации от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» определяет генотерапию как совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний. С появлением Федерального закона от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» можно прогнозировать рост клинических исследований принципиально новых генотерапевтических препаратов в России.

Технологии редактирования генома

Несмотря на существование множества методик направленного изменения сложных эукариотических геномов, в настоящее время на практике используют лишь несколько технологий:

- а) не индуцированную разрывом гомологичную рекомбинацию [33];
- б) сайт-специфичную рекомбинацию (рекомбиназы и транспозазы) [34, 35];
- в) индуцированную сайт-специфичной нуклеазой репарацию, где в качестве нуклеазы используют:

- искусственные (гибридные, «дизайнерские») нуклеазы с доменами «цинковых пальцев» (zinc finger nucleases, ZFNs) [36–38],
- природные или гибридные эндонуклеазы геномной конверсии или мегануклеазы (homing endonucleases, HEs) [39],
- искусственные (гибридные, «дизайнерские») нуклеазы с доменами аналогов активаторов транскрипции (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) [40],
- природные РНК-направляемые нуклеазы (RNA-guided nucleases, RGNs), в частности, CRISPR-ассоциированные нуклеазы (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9, CRISPR/Cas9) с «дизайнерской» наводящей РНК [41],
- сочетания перечисленных подходов [42–44].

На рис. 1 представлена шкала времени с указанием последовательности разработки некоторых технологий редактирования геномов [45].

На сегодняшний день наиболее перспективными являются подходы, основанные на использовании искусственных (гибридных, или «дизайнерских») сайт-специфичных нуклеаз: ZFNs, TALENs и CRISPR/Cas9 [46]. Хотя изначально термин «гибридные» («дизайнерские») нуклеазы применялся к полностью «белковым» технологиям ZFN и TALEN, сегодня к этому же классу можно с уверенностью отнести и технологию CRISPR/Cas9, поскольку РНК-компонент в этой системе является «дизайнерским» (аналогично наводящим блокам доменов ZF или TALE) (рис. 2) [47].

В общем случае каждый из перечисленных инструментов редактирования генома включает три компонента: специфичный к последовательности ДНК «наводчик» (указывающий, где резать), разрезающие ДНК «ножницы» (эндонуклеазу) и собственно привносимую последовательность ДНК (нужна не всегда). Доставка в клетки

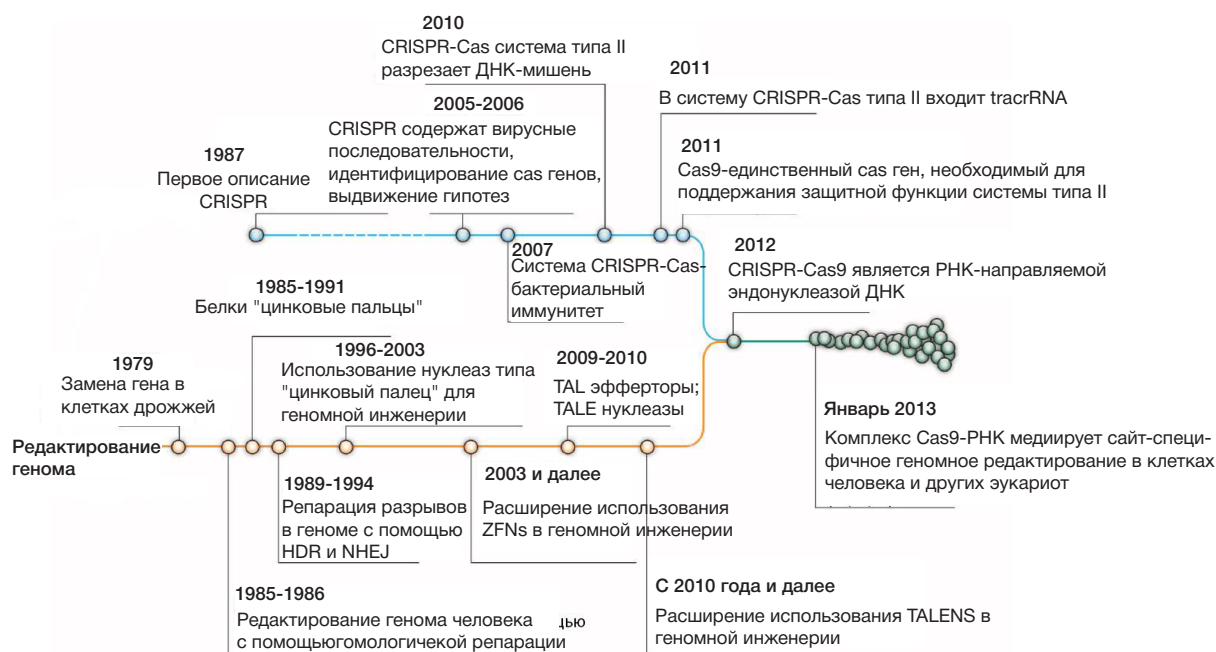


Рис. 1. Шкала времени с указанием последовательности разработки некоторых из систем редактирования геномов (Doudna, Charpentier, 2014 [45], в переводе Станислава Груздева, medach.pro)

«генетической заплатки» (фрагмента ДНК под замену) требуется в тех случаях, когда необходимо добавить или заменить фрагмент генома. Однако в ряде случаев достаточно просто удалить часть последовательности. В табл. 1 указаны особенности наиболее популярных систем редактирования генома.

С помощью «наводчика» мы указываем эндонуклеазе, где необходимо внести надрез в молекулу ДНК. Сшивание же надреза происходит, как правило, за счет внутриклеточных систем репарации (в частности, репарации двуцепочечных разрывов или гомологичной рекомбинации).

Поскольку методы изменения генома, основанные на гомологичной рекомбинации, рекомбиназах и транспозазах, активно используют в клинической практике уже более 30 лет и они широко описаны в литературе (за методы с гомологичной рекомбинацией в 2007 г. даже была вручена Нобелевская премия), в данном обзоре мы позволим себе не приводить их детали. Рассмотрим чуть подробнее сравнительно новые подходы, основанные на гибридных нуклеазах и мегануклеазах и репарации наведенных двуцепочечных разрывов.

Наводка нуклеазы «цинковыми пальцами» (ZFNs)

Примерно в середине 1980-х гг. (впервые в составе транскрипционного фактора TFIIIA *Xenopus laevis*) были идентифицированы небольшие домены, стабилизированные одним или несколькими ионами цинка и получившие название «цинковые пальцы». Эти домены способны эффективно и довольно специфично к последовательности связывать ДНК, РНК, белки и липиды [48]. Оказалось, что один «цинковый палец» специфично связывает триплет нуклеотидов. Если 3–6 «цинковых пальцев» с известной специфичностью соединить в один белок, можно добиться достаточно точного узнавания последовательности ДНК в 9–18 пар нуклеотидов. Если при этом к «цинковым пальцам» добавить какую-нибудь эндонуклеазу (чаще всего используют неспецифичный к последовательности и вносящий одноцепочечный разрыв каталитический домен нуклеазы FokI из *Flavobacterium okeanokoites*), получится наводимая на цель (на конкретный сайт в ДНК) эндонуклеаза. Для получения двуцепочечного разрыва необходимо создать два таких фермента, узнающих близлежащие регионы на противоположных цепях ДНК (рис. 2).

С начала 2000-х гг. и до настоящего времени системы на основе «цинковых пальцев» успешно использовали в широком спектре практических модификаций геномов как на растительных и животных моделях, так и в терапевтических подходах (табл. 2). Преимущество метода — универсальность способа наведения нуклеазы. К его недостаткам относятся довольно высокая сложность генно-инженерной сборки гена фермента; необходимость создать

два фермента для каждой из цепей ДНК; токсичность, связанная с недостаточной специфичностью систем данного типа [49]; риск иммуногенности чужеродного белка [50]. В этой связи применение систем на основе «цинковых пальцев» постепенно вытесняется новыми подходами.

Гибридные мегануклеазы

В 2003 г. Epinat и соавт. предложили метод геномного редактирования, основанный на так называемых мегануклеазах [39] (рис. 2). Мегануклеазы найдены у архей, бактерий, фагов, дрожжей, водорослей и некоторых растений и представляют собой эндодезоксирибонуклеазы — небольшие белки, зеркальные мономеры или гомодимеры, характеризующиеся очень длинным сайтом распознавания последовательности двуцепочечной ДНК: примерно от 10 до 40 пар нуклеотидов. Обычно сайт такой длины встречается лишь раз на геноме (или даже ни разу). Например, последовательность сайта узнавания мегануклеазы I-SCEI длиной 18 п. н. теоретически встретится один раз в геноме, превышающем по длине геном человека в 20 раз. Как правило, они находятся в составе интронов или мобильных элементов генома. Биологическая функция мегануклеаз неясна.

Наибольшее распространение как инструмент геномного редактирования получили представители семейства мегануклеаз LAGLIDADG, обнаруженных в митохондриях и хлоропластах одноклеточных эукариот. Достоинства метода — довольно высокая сайт-специфичность и самопроизвольная сборка димера. Недостаток — крайняя ограниченность выбора сайта воздействия.

Технология TALEN (нуклеазы, подобные аналогу активатора транскрипции)

История разработки системы TALEN связана с исследованием бактерий рода *Xanthomonas*. Причиной многолетнего изучения этой группы бактерий стало их патогенное воздействие на культурные растения: томаты, перец, рис и ряд других. Было установлено, что *Xanthomonas* секретируют в цитоплазму растительных клеток регуляторные белки (transcription activator-like effectors, TALE), увеличивающие восприимчивость клетки к патогену. При дальнейшем изучении механизмов действия данных белков было обнаружено, что они способны связываться с ДНК и активировать экспрессию некоторых генов, имитируя факторы транскрипции клетки-хозяина [51, 52].

Оказалось, что узнавание TALE определенного сайта в ДНК идет за счет серии небольших доменов, каждый из которых узнает один-единственный нуклеотид в последовательности сайта. Исследователи довольно быстро разобрались со специфичностью доменов к конкретным

Таблица 1. Состав компонентов основного фермента систем редактирования генома и некоторые особенности систем

Технология	Ограничения по последовательности	«Наводчик»	«Ножницы»	Двуцепочечный разрыв обеспечивает:
ZFNs	Практически нет	3–6 белковых домена типа «цинковый палец»	Неспецифичная к последовательности эндонуклеаза (например FokI)	искусственный гетеродимер
HEs	Ограниченный набор сайтов	Мегануклеаза	Мегануклеаза	естественный зеркальный мономер или гомодимер
TALENs	Практически нет	12–20 белковых доменов от «активаторов транскрипции»	Неспецифичная к последовательности эндонуклеаза (например FokI)	искусственный гетеродимер
RGNs (CRISPR/Cas9)	Нет	РНК длиной около 40 нуклеотидов	Нуклеаза Cas9	естественный мономер

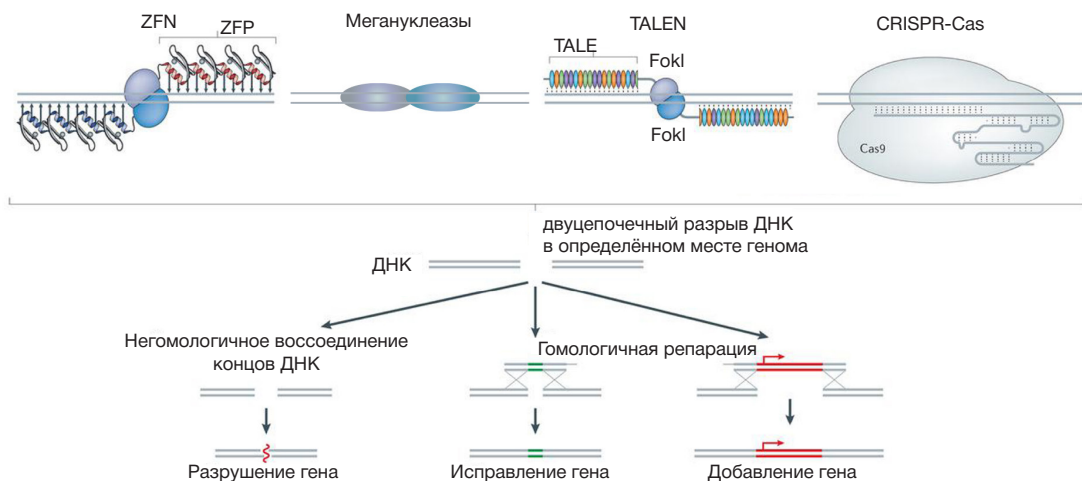


Рис. 2. Схема геномного редактирования на основе гибридных нуклеаз с «цинковыми пальцами», мегануклеаз, гибридных нуклеаз с TALE и CRISPR/Cas9 (Yip и соавт., 2014 [47], с дополнениями)

нуклеотидам, что позволило собирать из них «пачки», точно распознающие определенную последовательность оснований в ДНК.

Таким образом, принцип использования системы TALEN аналогичен описанной выше системе с использованием триплет-специфичных доменов «цинковых пальцев» с той лишь разницей, что в качестве «наводчика» используют нуклеотид-специфичные домены «аналогов активаторов транскрипции», соединенные в серии по 12–20 штук. В качестве нуклеазы используют тот же каталитический домен FokI. Для получения двухцепочечного разрыва необходимо создать два таких фермента, целевые сайты посадки TALE-«наводчиков» которых должны находиться на противоположных цепях ДНК и быть разделены участком около 20 п. н. (рис. 2). Достоинствами метода являются универсальность способа наведения нуклеазы и универсальность технологии сборки «дизайнерской» нуклеазы, а недостатками — высокая сложность генно-инженерной сборки гена фермента и необходимость создавать два фермента для каждой из цепей ДНК.

Существуют и попытки «скрещивания» отдельных элементов разных технологий. Так, описаны гибриды TALE-«наводчика» и мегануклеазы (megaTALs) [42]. К мегануклеазам пытаются прикреплять ферменты, тем или иным способом обрабатывающие (например разрушающие) концы двухцепочечного разрыва, с целью усиления мутагенного эффекта этого разрыва и т. п. [43, 44].

В 2012 г. журнал *Nature Methods* назвал методы высокоточного редактирования геномов (среди которых была и система TALEN) методическим открытием года.

Технология CRISPR/Cas9 (нуклеаза, ассоциированная с короткими регулярно расположенными палиндромными повторами)

Принципиально иной с точки зрения механизма наведения нуклеазы на цель является предложенная спустя всего несколько лет после TALEN система CRISPR/Cas9. Она отличается от описанных выше тем, что в качестве «наводчика» в ней используют не белковые домены, а молекулу РНК (single guide RNA, sgRNA) длиной около 40 нуклеотидов, состоящую из двух частей: собственно наводящей crRNA и адаптерной (транс-активационной) tracrRNA. Еще в конце 1980-х гг. в геноме бактерий и архей были обнаружены ре-

гионы CRISPR. Оказалось, что это своеобразный элемент «иммунной системы» бактерии, защищающий ее от чужеродных ДНК (например от проникновения бактериофагов) путем считывания повторов с комплементарных ДНК фага молекул РНК, которые в ассоциации со специальной нуклеазой разрушают геном фага. Причем бактерии умеют «запоминать» в своем геноме последовательности ДНК заражавших их вирусов с тем, чтобы в дальнейшем использовать их для считывания «наводящих» РНК [53].

Оказалось также, что последовательность этих «наводящих» РНК можно менять, делая их комплементарными любому участку ДНК без потери нуклеазной активности фермента Cas9 (рис. 2). Более того, можно использовать саму РНК как донор «генетической заплатки», если встроить в нее соответствующую последовательность [54].

На данный момент система CRISPR/Cas9 выглядит наиболее перспективным инструментом редактирования генома, поскольку она универсальна, довольно проста в исполнении и обладает высокой сайт-специфичностью.

У метода сразу несколько важных достоинств: универсальность способа наведения нуклеазы; отсутствие потребности в генно-инженерной сборке фермента — меняется только наводящая РНК; способность нуклеазы Cas9 резать обе цепи ДНК; возможность встроить «генетическую заплатку» в наводящую РНК. Недостаток метода — потенциальная иммуногенность чужеродного белка.

Алгоритмы проведения геномной терапии

Терапевтические направления использования систем редактирования генома можно разделить на три группы: 1) изменение генома гамет/зиготы/бластомеров с целью получения целого организма из одной измененной клетки (фетальная генотерапия); 2) изменение генома отобранных из организма отдельных соматических клеток с целью последующего возврата в организм измененных клеток (клеточная соматическая генотерапия); 3) изменение генома отдельных групп (или всех) соматических клеток непосредственно в многоклеточном организме (тканевая соматическая генотерапия).

Если первые два подхода предполагают манипуляции с культурами клеток в лабораторных условиях (для чего на данный момент выработана широчайшая технологическая база), то для третьего направления необходимо

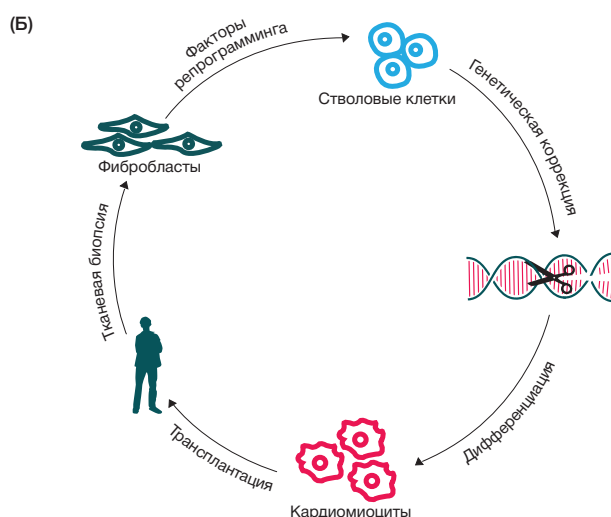
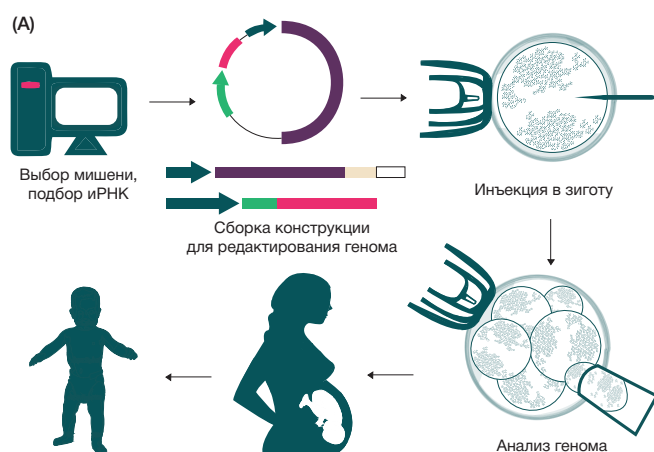


Рис. 3. Алгоритмы фетальной (А) и клеточной соматической генотерапии (Б)

использовать специальные системы (желательно тканеспецифичной) доставки генно-инженерных конструкций в клетки организма.

Генно-инженерные конструкции

Как правило, гибридные нуклеазы и «генетические заплатки» (генетический материал под замену) доставляют в клетку в виде генно-инженерных конструкций, с которых уже внутри клетки нарабатываются соответствующие РНК и белки. Описаны варианты прямого введения в клетку матричной РНК, в частности, для системы CRISPR/Cas9 [55].

Типичная генетическая конструкция для системы сайт-специфичной дизайнерской нуклеазы содержит сигнал ядерной локализации, искусственный блок «наведения» («цинковые пальцы», TALE или наводящую РНК), каталитический домен нуклеазы (например FokI) и, если требуется, фрагмент под замену.

Системы доставки генотерапевтических препаратов в клетки

С целью доставки «терапевтических» генов или генетических конструкций разработаны разнообразные вирусные и невирусные системы, распознающие большое число потенциальных тканей-мишеней (кожа, мышцы, легкие, мозг, толстая кишка, селезенка, печень, клетки крови и т. д.). Система доставки должна обеспечивать высокую эффективность поглощения генетической конструкции клетками-мишенями, устойчивость к внутриклеточному разрушению при транспорте в ядро и поддержание необходимого уровня экспрессии.

Невирусные системы включают прямое введение ДНК-конструкций в клетки и ткани (например электропорацию), липосомы, катионные полимеры и др. Среди вирусных систем наиболее распространены системы на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов и вируса простого герпеса. Адресная доставка определяется наличием на поверхности вирусных частиц или на мембране липосом специальных молекул, узнаваемых рецепторами клеток-мишеней. Такими молекулами могут быть белки вирусного капсида, антитела к поверхностным клеточным антигенам (встраивают в мембрану липосом), молекулы фолиевой кислоты

(усиленно захватываемые опухолевыми клетками) и др.

Для доставки векторов с гибридными нуклеазами также пытаются применять вирусные и невирусные способы доставки [47, 56].

Геномная терапия наследственных заболеваний

Как уже было сказано выше, терапевтические подходы, основанные на добавлении генетического материала в клетку при помощи вирусных векторов, используют с начала 1990-х гг. Эти методы позволяют восстановить наработку белка, ген которого нефункционален в обеих копиях на хромосоме. Однако изменение или удаление участков ДНК долгое время оставалось крайне сложным и невозможным производимым подходом. С появлением «дизайнерских» нуклеаз стали бурно развиваться методы направленного изменения участков ДНК непосредственно в структуре хромосомы. На сегодняшний день предложены варианты лечения пигментного ретинита, глаукомы, гемоглобинопатий, мышечных дистрофий (табл. 2).

Наиболее активно развивается фетальное направление. В 2015–2016 гг. о своих планах по модификации геномов человеческих эмбрионов при помощи технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 заявило множество лабораторий в США, Китае, Великобритании и ряде других стран, а также несколько биотехнологических компаний: Ovascience (США), Editas Medicine (США) и др. Если у данной пары индивидов из «естественных» вариантов эмбрионов не может быть отобран потенциально здоровый генотип, возможно использование методов редактирования генома с целью добавления/исправления патогенного аллеля на стадии зиготы.

В апреле 2015 г. вышла работа Liang и соавт., в которой при помощи системы CRISPR/Cas9 на уровне зиготы производили «починку» мутантного гена бета-глобина. Из 86 взятых в эксперимент зигот починка произошла в 4-х случаях [7].

Геномная терапия соматических мутаций

«Через 20 лет химиотерапия уйдет в прошлое, — уверен глава Wellcome Trust Sanger Institute, профессор Джереми Фаррер. — Мы будем оглядываться на сегодняшние методы лечения рака и ужасаться им. Равно как сегодня

ужасаемся примерам лечения электричеством в начале прошлого века. Генетика — главное подспорье медицины в будущем. Редкие врожденные пороки, рак и даже инфекции мы будем лечить, используя геномную терапию» [57].

«Дизайнерские» нуклеазы позволяют эффективно и точно воздействовать на ДНК с целью исправления возникших мутаций, что открывает широкие возможности их использования в исправлении нарушений, повлекших опухолеобразование [29, 30]. Предложены варианты использования системы CRISPR/Cas9 для лечения саркомы, рака легких [31, 32]. В частности, для рака легких предложен вариант исправления или удаления мутантного варианта гена EGFR при помощи доставляемой вирусом системы CRISPR/Cas9 [32].

Антивирусная терапия

Геномная терапия ВИЧ

Еще одним направлением терапевтического применения гибридных нуклеаз является борьба с ВИЧ-инфекцией. Сегодня существует два направления борьбы: удаление копий ВИЧ из генома ВИЧ-носителя и изменение генов рецепторов, через которые вирус проникает в Т-лимфоциты (в частности, гена *CCR5*) (табл. 2). Уничтожая копии провирусной ДНК в геноме, теоретически можно полностью обезвредить вирус и исключить возможность его реактивации в клетках пациента. Другой подход — нарушение гена рецептора — не позволяет вирусу заражать лимфоциты, и популяция Т-клеток пациента восстанавливается.

Одна из проблем в разработке противовирусных препаратов на основе геномного редактирования заключается в способности вируса чрезвычайно быстро менять последовательность и тем самым уходить от «наводчика», специфичного к определенной последовательности сайта атаки. Однако при правильном законодательном регулировании выпуска модификаций генотерапевтических препаратов мы легко можем обгонять ВИЧ в выпуске очередных версий «антивируса».

Борьба с не встраивающимися вирусами

Системы редактирования генома пытаются применять и для борьбы с вирусами, не интегрирующими свой генетический материал в клеточный геном. Принцип их уничтожения тот же, что и в случае с ВИЧ, но гибридная нуклеаза атакует свободный вирусный геном. Так, описано применение системы CRISPR/Cas9 для борьбы с вирусом гепатита В [58].

Нетерапевтические задачи геномного редактирования

Генетический допинг

Генетический допинг представляет собой вариант нетерапевтического применения редактирования генома с целью улучшения результатов в спорте высоких достижений. Не секрет, что максимальные спортивные результаты во многом определяются генетической составляющей индивида. В марафоне почти всегда побеждает спортсмен из Кении или Эфиопии, поскольку в африканской популяции этих стран наиболее развит генетически детерминированный путь метаболизма глюкозы, определяющий способность быстро бежать марафон.

Со спортивной успешностью на сегодня связывают более 150 полиморфных позиций в ДНК, из которых 93 ассоциированы с выносливостью и 62 — с силовой нагрузкой [91]. Спектр потенциальных генов воздействия при помощи геномного редактирования очень широк: эритропоэтин, инсулиноподобный фактор роста 1, человеческий гормон роста, миостатин, эндотелиальный фактор роста, фактор роста фибробластов, эндорфины, энкефалины, гены белков цитоскелета и т. д. Для ряда этих генов уже разработаны подходы и проведены клинические испытания по введению в геном человека конкретных аллелей генов [85].

Репрогенетика

В классической интерпретации репрогенетика предполагает отбор человеческих эмбрионов с определёнными свойствами из получаемых «естественных» вариантов. Однако технология редактирования генома позволяет расширить возможности подхода за счет создания вариантов, невозможных для данной пары родителей [88]. При этом возникает множество вопросов этического свойства, которые человечеству еще предстоит решить [90].

Этические вопросы геномного редактирования и правовое регулирование

Несмотря на то, что технологии геномного редактирования с использованием «дизайнерских» нуклеаз обладают огромным потенциалом создания эффективной терапии для пациентов, страдающих от генетических заболеваний, их применение в терапевтических целях все еще находится в зачаточном состоянии. В этой связи развитие этической и нормативно-правовой базы, обеспечивающей эффективность и безопасность использования геномного

Таблица 2. Примеры заболеваний, для лечения которых используют геномное редактирование на основе дизайнерских нуклеаз

Область действия	Принципы	Методы	Ссылка
Наследственные заболевания глаз	Разрушение гена	TALENs, CRISPR/Cas9	[59-63]
Гемоглобинопатии (серповидноклеточная анемия, β -талассемия)	Вставка рабочего гена β -глобина	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9	[7-13]
Мышечные дистрофии	Вставка рабочего гена дистрофина или удаление «плохого» экзона в имеющемся гене	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9	[64-71]
Онкология	Удаление или исправление мутантного варианта гена	TALENs, CRISPR/Cas9	[29-32]
ВИЧ	Вырезание копии ДНК вируса из генома человека или удаление гена рецептора, через который вирус проникает в клетку	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9	[72-82]
Вирус гепатита В	Уничтожение генома вируса	CRISPR/Cas9	[58]
Генетический допинг	Добавление требуемого аллеля гена	TALENs, CRISPR/Cas9	[83-87]
Репрогенетика	Все виды изменений	TALENs, CRISPR/Cas9	[83-87]

редактирования, чрезвычайно важно [92].

В рамках работы этических комитетов и уполномоченных государственных органов необходимо фиксировать и уточнять аспекты, оказывающие влияние на клиническую реализацию технологий редактирования генома. Эти структуры должны предложить такую «дорожную карту» развития и внедрения технологий геномного редактирования, которая позволит безопасно и быстро переводить новейшие методы в клиническую практику.

Опережающее развитие принципиально новых технологий в медицине не позволяет законодателю работать над правовой основой их использования так же, как раньше. В настоящее время назрела смена парадигмы законодательного регулирования выхода новых медицинских технологий из научно-исследовательской лаборатории в клинику. Глобализация привела к тому, что инновации распространяются по миру буквально со скоростью света. Новая перспективная медицинская технология, где бы она ни была создана, неизбежно находит развитие и используется в первую очередь в странах с более гибким или либеральным законодательством. Такие государства получают «фору» за счет раннего внедрения инновационных подходов даже с учетом рисков, заключенных в нем. Многие законодательные ограничения перехода «наука–медицина» в отдельных странах не имеют смысла, поскольку технологии, созданные в этих странах, рано или поздно попадают в «научные офшоры», откуда быстро распространяют по остальному миру, а также привлекают на территорию «офшоров» клиентов.

Некоторые страны сперва пытаются запрещать применение систем редактирования генома человека при по-

мощи «дизайнерских» нуклеаз, однако вынуждены быстро менять позицию, дабы не оказаться в хвосте технологических лидеров. После выхода в 2015 г. работы китайских авторов по редактированию генома человеческих эмбрионов методом CRISPR/Cas9 в феврале 2016 г. группе британских ученых было дано разрешение на генетическую модификацию человеческих эмбрионов с помощью CRISPR/Cas9 и родственных методов «дизайнерских» нуклеаз [93].

Общественное мнение на фоне внедрения технологий в отдельных юрисдикциях быстро меняется и начинает давить на собственное законодательное регулирование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Созданные за последние несколько лет методы редактирования генома представляют собой развитие существующих с конца прошлого века подходов к генной терапии. Однако можно с уверенностью утверждать, что сегодня мы наблюдаем смену парадигмы в области геномной медицины. На начало второго десятилетия XXI в. пришлось сразу несколько технологических прорывов, обладающих мощным синергетическим эффектом: усовершенствование технологий направленной клеточной дифференцировки, значительное удешевление и рутинное применение геномных секвенаторов и создание описанных в данном обзоре систем редактирования генома. Все это в сумме неизбежно приведет к появлению в ближайшие 3–5 лет персонализированной геномной медицины нового качества. Технологии направленного изменения генома станут рутинным инструментом врача-клинициста.

Литература

- Friedmann T, Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science*. 1972; 175 (4025): 949–55. doi:10.1126/science.175.4025.949.
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990 Aug 30; 323 (9): 570–8. doi:10.1056/NEJM199008303230904.
- Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Database [Интернет]. John Wiley and Sons Ltd., provided by the Journal of Gene Medicine. с2016 – [обновлено: февраль 2016 г.; дата обращения: июнь 2016 г.]. Доступно по ссылке: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
- De Ravin SS, Wu X, Moir S, Anaya-O'Brien S, Kwatemaa N, Little P, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med*. 2016 Apr 20; 8 (335): 335ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.aad8856.
- Ward P, Walsh CE. Current and future prospects for hemophilia gene therapy. *Expert Rev Hematol*. 2016 May 26: 1–11. [Epub ahead of print].
- Swystun LL, Lillicrap D. Gene Therapy for Coagulation Disorders. *Circ Res*. 2016 Apr 29; 118 (9): 1443–52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307015.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5. Epub 2015 Apr 18.
- Canver MC, Orkin SH. Customizing the genome as therapy for the β -hemoglobinopathies. *Blood*. 2016 May 26; 127 (21): 2536–45. doi: 10.1182/blood-2016-01-678128. Epub 2016 Apr 6.
- Cottle RN, Lee CM, Bao G. Treating hemoglobinopathies using gene-correction approaches: promises and challenges. *Hum Genet*. 2016 Jun 17. [Epub ahead of print].
- Tasan I, Jain S, Zhao H. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. *Hum Genet*. 2016 Jun 1. [Epub ahead of print].
- Osborn MJ, Belanto JJ, Tolar J, Voytas DF. Gene editing and its application for hematological diseases. *Int J Hematol*. 2016 May 27. [Epub ahead of print].
- Yang Y, Zhang X, Yi L, Hou Z, Chen J, Kou X, et al. Naive Induced Pluripotent Stem Cells Generated From β -Thalassemia Fibroblasts Allow Efficient Gene Correction With CRISPR/Cas9. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jan; 5 (1): 8–19. doi: 10.5966/sctm.2015-0157. Epub 2015 Dec 16. Erratum in: *Stem Cells Transl Med*. 2016 Feb; 5 (2): 267.
- Smith EC, Orkin SH. Hemoglobin genetics: recent contributions of GWAS and gene editing. *Hum Mol Genet*. 2016 Jun 23. pii: ddw170. [Epub ahead of print].
- Lee TW, Southern KW, Perry LA, Penny-Dimri JC, Aslam AA. Topical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene replacement for cystic fibrosis-related lung disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jun 17; 6: CD005599.
- Alton EW, Armstrong DK, Ashby D, Bayfield KJ, Bilton D, Bloomfield EV, et al. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med*. 2015 Sep; 3 (9): 684–91. doi:10.1016/S2213-2600(15)00245-3.
- Ye GJ, Budzynski E, Sonnentag P, Nork TM, Sheibani N, Gurel Z, et al. Cone-Specific Promoters for Gene Therapy of Achromatopsia and Other Retinal Diseases. *Hum Gene Ther*. 2016 Jan; 27 (1): 72–82. doi: 10.1089/hum.2015.130.
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Bennicelli J, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008; 358 (21): 2240–8. doi:10.1056/NEJMoa0802315.
- Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al. Effect of gene therapy on visual function in

- Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 2008; 358 (21): 2231–9. doi:10.1056/NEJMoa0802268.
19. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, et al. Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial. *Hum Gene Ther.* 2008 Oct; 19 (10): 979–90. doi:10.1089/hum.2008.107.
20. Walker MC, Schorge S, Kullmann DM, Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L. Gene therapy in status epilepticus. *Epilepsia.* 2013 Sep; 54 Suppl 6: 43–5. doi:10.1111/epi.12275.
21. Giuncamp C, Pap T, Schedel J, Pap G, Moller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Gene therapy in osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2000; 67 (6): 570–1.
22. Evans CH, Gouze JN, Gouze E, Robbins PD, Ghivizzani SG. Osteoarthritis gene therapy. *Gene Ther.* 2004 Feb; 11 (4): 379–89. doi:10.1038/sj.gt.3302196.
23. Carlsson T, Winkler C, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Cenci A, et al. Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors. *Brain.* 2005 Mar; 128 (Pt 3): 559–69. doi:10.1093/brain/awh374.
24. Forsayeth J, Bankiewicz KS, Aminoff MJ. Gene therapy for Parkinson's disease: Where are we now and where are we going? *Expert Rev Neurother.* 2010 Dec; 10 (12): 1839–45. doi:10.1586/ern.10.161.
25. Palfi S, Gurruchaga, JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavisce S, Buttery PC, et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: A dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet.* 2014 Mar 29; 383 (9923): 1138–46. doi:10.1016/S0140-6736(13)61939-X.
26. Cross D, Burmester JK. Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clin Med Res.* 2006 Sep; 4 (3): 218–27.
27. Andersen JB, Thorgerisson SS. A perspective on molecular therapy in cholangiocarcinoma: present status and future directions. *Hepat Oncol.* 2014 Jan 1; 1 (1): 143–57.
28. Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther.* 2014 Sep 10; 2: 27. doi:10.1186/2052-8426-2-27.
29. Khan FA, Pandupuspitasari NS, Chun-Jie H, Ao Z, Jamal M, Zohaib A, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget.* 2016 May 26. doi:10.18632/oncotarget.9646. [Epub ahead of print].
30. White MK, Khalili K. CRISPR/Cas9 and cancer targets: future possibilities and present challenges. *Oncotarget.* 2016 Mar 15; 7 (11): 12305–17. doi:10.18632/oncotarget.7104.
31. Liu T, Shen JK, Li Z, Choy E, Hornicek FJ, Duan Z. Development and potential applications of CRISPR-Cas9 genome editing technology in sarcoma. *Cancer Lett.* 2016 Apr 1; 373 (1): 109–18. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.030. Epub 2016 Jan 21.
32. Tang H, Shrager JB. CRISPR/Cas-mediated genome editing to treat EGFR-mutant lung cancer: a personalized molecular surgical therapy. *EMBO Mol Med.* 2016 Jan 8; 8 (2): 83–5. doi:10.15252/emmm.201506006.
33. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Chapter 8.5: Gene Replacement and Transgenic Animals: DNA Is Transferred into Eukaryotic Cells in Various Ways. In: *Molecular Cell Biology.* 4th ed. New York: W. H. Freeman; 2002. ISBN 0-7167-3136-3.
34. O'Gorman S, Fox DT, Wahl GM. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science.* 1991 Mar 15; 251 (4999): 1351–5. doi:10.1126/science.1900642.
35. Karow M, Calos MP. The therapeutic potential of phiC31 integrase as a gene therapy system. *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Oct; 11 (10): 1287–96. doi:10.1517/14712598.2011.601293.
36. Pabo CO, Peisach E, Grant RA. Design and Selection of Novel Cys2His2 Zinc Finger Proteins. *Annu. Rev Biochem.* 2001; 70: 313–40.
37. Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell.* 2008 Jul 25; 31 (2): 294–301. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.016.
38. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics.* 2011 Aug; 188 (4): 773–82. doi:10.1534/genetics.111.131433.
39. Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochemaix P, Desfontaines D, Puzin C, et al. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jun 1; 31 (11): 2952–62. doi:10.1093/nar/gkg375.
40. Boch J. TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol.* 2011 Feb; 29 (2): 135–6. doi:10.1038/nbt.1767.
41. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods.* 2013 Oct; 10 (10): 957–63. doi:10.1038/nmeth.2649.
42. Boissel S, Jarjour J, Astrakhan A, Adey A, Gouble A, Duchateau P, et al. megaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 2014 Feb; 42 (4): 2591–601. doi:10.1093/nar/gkt1224.
43. Certo MT, Gwiazda KS, Kuhar R, Sather B, Curinga G, Mandt T, et al. Coupling endonucleases with DNA end-processing enzymes to drive gene disruption. *Nat Methods.* 2012 Oct; 9 (10): 973–5. doi:10.1038/nmeth.2177.
44. Delacôte F, Perez C, Guyot V, Duhamel M, Rochon C, Ollivier N, et al. High frequency targeted mutagenesis using engineered endonucleases and DNA-end processing enzymes. *PLoS One.* 2013; 8 (1): e53217. doi:10.1371/journal.pone.0053217.
45. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014 Nov 28; 346 (6213): 1258096. doi:10.1126/science.1258096.
46. Немудрый А. А., Валетдинова К. Р., Медведев С. П., Закирян С. М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas — инструменты открытий. *Acta naturae.* 2014; т. 6, 3 (22): 20–41.
47. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014 Aug; 15 (8): 541–55. doi:10.1038/nrg3763. Epub 2014 Jul 15.
48. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Feb 6; 93 (3): 1156–60.
49. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing Off-Target Cleavage Specificities of Zinc Finger Nucleases by in Vitro Selection. *Nat Methods.* 2011 Aug 7; 8 (9): 765–70. doi:10.1038/nmeth.1670.
50. Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. *Science.* 2011 Jul 15; 333 (6040): 307. doi:10.1126/science.1207773.
51. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science.* 2009 Dec 11; 326 (5959): 1509–12. doi:10.1126/science.1178811.
52. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science.* 2009 Dec 11; 326 (5959): 1501. Bibcode:2009Sci...326.1501M. doi:10.1126/science.1178817. PMID 19933106.
53. Horvath P, Barrangou R (January 2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea". *Science* 327 (5962): 167–70. doi:10.1126/Science.1179555.
54. Swarts DC, Mosterd C, van Passel MW, Brouns SJ. CRISPR interference directs strand specific spacer acquisition. *PLoS One.* 2012; 7 (4): e35888. doi:10.1371/journal.pone.0035888.
55. Boroviak K, Doe B, Banerjee R, Yang F, Bradley A. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9. *Genesis.* 2016 Feb; 54 (2): 78–85. doi:10.1002/dvg.22915. Epub 2016 Jan 25.
56. Yin H, Song CQ, Dorkin JR, Zhu LJ, Li Y, Wu Q, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol.* 2016 Mar; 34 (3): 328–33. doi:10.1038/nbt.3471. Epub 2016 Feb 1.
57. End of chemotherapy within 20 years as pioneering DNA project launched. *The Daily Telegraph.* 01.08.2014
58. Zhu W, Xie K, Xu Y, Wang L, Chen K, Zhang L, Fang J. CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and

- transgenic mouse. *Virus Res.* 2016 Jun 2; 217: 125–32. doi: 10.1016/j.virusres.2016.04.003. Epub 2016 Apr 2.
59. Hung SS, McCaughy T, Swann O, Pébay A, Hewitt AW. Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Jun; 53: 1–20. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.05.001. [Epub ahead of print].
 60. Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci Rep.* 2016 Jan 27; 6:19969. doi: 10.1038/srep19969.
 61. Nafissi N, Foldvari M. Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools. *Front Neurosci.* 2015 Oct 14; 9: 355. doi: 10.3389/fnins.2015.00355.
 62. Li Y, Chan L, Nguyen HV, Tsang SH. Personalized Medicine: Cell and Gene Therapy Based on Patient-Specific iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 854: 549–55. doi: 10.1007/978-3-319-17121-0_73
 63. Wu WH, Tsai YT, Justus S, Lee T, Zhang L, Lin CS, et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther.* 2016 May 20. doi: 10.1038/mt.2016.107. [Epub ahead of print].
 64. Mendell JR, Rodino-Klapac LR. Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment. *Cell Res.* 2016 May; 26 (5): 513–4. doi: 10.1038/cr.2016.28. Epub 2016 Mar 1.
 65. Himeda CL, Jones TI, Jones PL. Scalpel or Straitjacket: CRISPR/Cas9 Approaches for Muscular Dystrophies. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Apr; 37 (4): 249–51. doi: 10.1016/j.tips.2016.02.001. Epub 2016 Feb 22.
 66. Iyombe-Engembe JP, Ouellet DL, Barbeau X, Rousseau J, Chapdelaine P, Lagüe P, Tremblay JP. Efficient Restoration of the Dystrophin Gene Reading Frame and Protein Structure in DMD Myoblasts Using the CinDel Method. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016 Jan 26; 5: e283. doi: 10.1038/mtna.2015.58.
 67. Maggio I, Stefanucci L, Janssen JM, Liu J, Chen X, Mouly V, Gonçalves MA. Selection-free gene repair after adenoviral vector transduction of designer nucleases: rescue of dystrophin synthesis in DMD muscle cell populations. *Nucleic Acids Res.* 2016 Feb 18; 44 (3): 1449–70. doi: 10.1093/nar/gkv1540. Epub 2016 Jan 13.
 68. Kawecka K, Theodoulides M, Hasoglu Y, Jarmin S, Kymalainen H, Le-Heron A, et al. Adeno-Associated Virus (AAV) Mediated Dystrophin Gene Transfer Studies and Exon Skipping Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *Curr Gene Ther.* 2015; 15 (4): 395–415.
 69. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015 Feb 18; 6: 6244. doi: 10.1038/ncomms7244.
 70. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Perez-Pinera P, Brown MT, Majoros WH, et al. Correction of dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol Ther.* 2015 Mar; 23 (3): 523–32. doi: 10.1038/mt.2014.234. Epub 2014 Dec 10.
 71. Maggio I, Chen X, Gonçalves MA. The emerging role of viral vectors as vehicles for DMD gene editing. *Genome Med.* 2016 May 23; 8 (1): 59. doi: 10.1186/s13073-016-0316-x.
 72. Reardon S. Gene-editing method tackles HIV in first clinical test. *Nature.* 2014 Mar 05. doi: 10.1038/nature.2014.14813.
 73. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014 Mar 6; 370 (10): 901–10. doi: 10.1056/NEJMoa1300662.
 74. Kaminski R, Bella R, Yin C, Otte J, Ferrante P, Gendelman HE, et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther.* 2016 May 19. doi: 10.1038/gt.2016.41. [Epub ahead of print].
 75. Ueda S, Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Koyanagi Y. Insufficient anti-HIV-1 potency of the CRISPR/Cas9 system for full viral replication. *Microbiol Immunol.* 2016 Jun 9. doi: 10.1111/1348-0421.12395. [Epub ahead of print].
 76. Stone D, Niyonzima N, Jerome KR. Genome editing and the next generation of antiviral therapy. *Hum Genet.* 2016 Jun 8. [Epub ahead of print].
 77. Pernet O, Yadav SS, An DS. Stem cell-based therapies for HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 May 2. pii: S0169-409X(16)30137-5. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.027. [Epub ahead of print].
 78. Kim M, Siliciano RF. Genome editing for clinical HIV isolates. *Nat Biotechnol.* 2016 Apr 7; 34 (4): 388–9. doi: 10.1038/nbt.3531.
 79. Wang CX, Cannon PM. The clinical applications of genome editing in HIV. *Blood.* 2016 May 26; 127 (21): 2546–52. doi: 10.1182/blood-2016-01-678144. Epub 2016 Apr 6.
 80. Wang Z, Pan Q, Gendron P, Zhu W, Guo F, Cen S, et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep.* 2016 Apr 19; 15 (3): 481–9. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.042. Epub 2016 Apr 7.
 81. Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Mol Ther.* 2016 Mar; 24 (3): 522–6. doi: 10.1038/mt.2016.24. Epub 2016 Jan 22.
 82. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Yet al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep.* 2016 Mar 4; 6: 22555. doi: 10.1038/srep22555.
 83. Momaya A, Fawal M, Estes R. Performance-enhancing substances in sports: a review of the literature. *Sports Med.* 2015 Apr; 45 (4): 517–31. doi: 10.1007/s40279-015-0308-9.
 84. World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code: The 2015 Prohibited List of International Standards. Montreal (Quebec); 2014 Sep 20. 10 p.
 85. Adis Insight [Интернет]. Cham (Switzerland): Springer International Publishing AG; [дата обращения: июнь 2016 г.]. Drug Profile: Erythropoietin gene therapy — Oxford BioMedica. Доступно по ссылке: <http://adisinsight.springer.com/drugs/800017416>.
 86. Barry P. Finding the golden genes. *Science News.* 2008 Jul 18.
 87. Miah A. Genetically Modified Athletes: Biomedical Ethics, Gene Doping and Sport. London; New York: Routledge; 2004. 208 p.
 88. Regalado A. Engineering the Perfect Baby. *MIT Technology Review.* 2015 Mar 5.
 89. Parens E, Knowles LP. Reprogenetics and public policy. Reflections and recommendations. *Hastings Cent Rep.* 2003 Jul–Aug; 33 (4): S1–24.
 90. Pray L. Embryo screening and the ethics of human genetic engineering. *Nature Education.* 2008; 1 (1): 207.
 91. Ahmetov II, Egorova ES, Gabdrakhmanova LJ, Fedotovskaya ON. Genes and Athletic Performance: An Update. *Med Sport Sci.* 2016; 61: 41–54. doi: 10.1159/000445240. Epub 2016 Jun 10.
 92. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* 2015 Apr 3; 348 (6230): 36–3. doi: 10.1126/science.aab1028.
 93. Knapton S. British scientists granted permission to genetically modify human embryos. *The Daily Telegraph.* 2016 Feb 1.

References

- Friedmann T, Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science*. 1972; 175 (4025): 949–55. doi:10.1126/science.175.4025.949.
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990 Aug 30; 323 (9): 570–8. doi:10.1056/NEJM199008303230904.
- Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Database [Internet]. John Wiley and Sons Ltd., provided by the Journal of Gene Medicine. c2016 – [updated 2016 Feb; cited 2016 Jun]. Available from: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
- De Ravin SS, Wu X, Moir S, Anaya-O'Brien S, Kwatema N, Little P, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med*. 2016 Apr 20; 8 (335): 335ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.aad8856.
- Ward P, Walsh CE. Current and future prospects for hemophilia gene therapy. *Expert Rev Hematol*. 2016 May 26: 1–11. [Epub ahead of print].
- Swystun LL, Lillicrap D. Gene Therapy for Coagulation Disorders. *Circ Res*. 2016 Apr 29; 118 (9): 1443–52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307015.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5. Epub 2015 Apr 18.
- Canver MC, Orkin SH. Customizing the genome as therapy for the β -hemoglobinopathies. *Blood*. 2016 May 26; 127 (21): 2536–45. doi: 10.1182/blood-2016-01-678128. Epub 2016 Apr 6.
- Cottle RN, Lee CM, Bao G. Treating hemoglobinopathies using gene-correction approaches: promises and challenges. *Hum Genet*. 2016 Jun 17. [Epub ahead of print].
- Tasan I, Jain S, Zhao H. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. *Hum Genet*. 2016 Jun 1. [Epub ahead of print].
- Osborn MJ, Belanto JJ, Tolar J, Voytas DF. Gene editing and its application for hematological diseases. *Int J Hematol*. 2016 May 27. [Epub ahead of print].
- Yang Y, Zhang X, Yi L, Hou Z, Chen J, Kou X, et al. Naïve Induced Pluripotent Stem Cells Generated From β -Thalassemia Fibroblasts Allow Efficient Gene Correction With CRISPR/Cas9. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jan; 5 (1): 8–19. doi: 10.5966/sctm.2015-0157. Epub 2015 Dec 16. Erratum in: *Stem Cells Transl Med*. 2016 Feb; 5 (2): 267.
- Smith EC, Orkin SH. Hemoglobin genetics: recent contributions of GWAS and gene editing. *Hum Mol Genet*. 2016 Jun 23. pii: ddw170. [Epub ahead of print].
- Lee TW, Southern KW, Perry LA, Penny-Dimri JC, Aslam AA. Topical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene replacement for cystic fibrosis-related lung disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jun 17; 6: CD005599.
- Alton EW, Armstrong DK, Ashby D, Bayfield KJ, Bilton D, Bloomfield EV, et al. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med*. 2015 Sep; 3 (9): 684–91. doi:10.1016/S2213-2600(15)00245-3.
- Ye GJ, Budzynski E, Sonnentag P, Nork TM, Sheibani N, Gurel Z, et al. Cone-Specific Promoters for Gene Therapy of Achromatopsia and Other Retinal Diseases. *Hum Gene Ther*. 2016 Jan; 27 (1): 72–82. doi: 10.1089/hum.2015.130.
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Benniselli J, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008; 358 (21): 2240–8. doi:10.1056/NEJMoa0802315.
- Bainbridge JWB, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008; 358 (21): 2231–9. doi:10.1056/NEJMoa0802268.
- Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, et al. Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial. *Hum Gene Ther*. 2008 Oct; 19 (10): 979–90. doi:10.1089/hum.2008.107.
- Walker MC, Schorge S, Kullmann DM, Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L. Gene therapy in status epilepticus. *Epilepsia*. 2013 Sep; 54 Suppl 6: 43–5. doi:10.1111/epi.12275.
- Giuncamp C, Pap T, Schedel J, Pap G, Moller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Gene therapy in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2000; 67 (6): 570–1.
- Evans CH, Gouze JN, Gouze E, Robbins PD, Ghivizzani SG. Osteoarthritis gene therapy. *Gene Ther*. 2004 Feb; 11 (4): 379–89. doi: 10.1038/sj.gt.3302196.
- Carlsson T, Winkler C, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Cenci A, et al. Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors. *Brain*. 2005 Mar; 128 (Pt 3): 559–69. doi: 10.1093/brain/awh374.
- Forsayeth J, Bankiewicz KS, Aminoff MJ. Gene therapy for Parkinson's disease: Where are we now and where are we going? *Expert Rev Neurother*. 2010 Dec; 10 (12): 1839–45. doi: 10.1586/ern.10.161.
- Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavis S, Buttery PC, et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: A dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*. 2014 Mar 29; 383 (9923): 1138–46. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61939-X.
- Cross D, Burmester JK. Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clin Med Res*. 2006 Sep; 4 (3): 218–27.
- Andersen JB, Thorgeirsson SS. A perspective on molecular therapy in cholangiocarcinoma: present status and future directions. *Hepat Oncol*. 2014 Jan 1; 1 (1): 143–57.
- Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther*. 2014 Sep 10; 2: 27. doi: 10.1186/2052-8426-2-27.
- Khan FA, Pandupuspitasari NS, Chun-Jie H, Ao Z, Jamal M, Zohaib A, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget*. 2016 May 26. doi: 10.18632/oncotarget.9646. [Epub ahead of print].
- White MK, Khalili K. CRISPR/Cas9 and cancer targets: future possibilities and present challenges. *Oncotarget*. 2016 Mar 15; 7 (11): 12305–17. doi: 10.18632/oncotarget.7104.
- Liu T, Shen JK, Li Z, Choy E, Hornicek FJ, Duan Z. Development and potential applications of CRISPR-Cas9 genome editing technology in sarcoma. *Cancer Lett*. 2016 Apr 1; 373 (1): 109–18. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.030. Epub 2016 Jan 21.
- Tang H, Shrager JB. CRISPR/Cas-mediated genome editing to treat EGFR-mutant lung cancer: a personalized molecular surgical therapy. *EMBO Mol Med*. 2016 Jan 8; 8 (2): 83–5. doi: 10.15252/emmm.201506006.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Chapter 8.5: Gene Replacement and Transgenic Animals: DNA Is Transferred into Eukaryotic Cells in Various Ways. In: *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman; 2002. ISBN 0-7167-3136-3.
- O'Gorman S, Fox DT, Wahl GM. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*. 1991 Mar 15; 251 (4999): 1351–5. doi: 10.1126/science.1900642.
- Karow M, Calos MP. The therapeutic potential of phiC31 integrase as a gene therapy system. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Oct; 11 (10): 1287–96. doi:10.1517/14712598.2011.601293.
- Pabo CO, Peisach E, Grant RA. Design and Selection of Novel Cys2His2 Zinc Finger Proteins. *Annu. Rev Biochem*. 2001; 70: 313–40.
- Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*. 2008 Jul 25; 31 (2): 294–301. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.016.
- Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases.

- Genetics. 2011 Aug; 188 (4): 773–82. doi: 10.1534/genetics.111.131433.
39. Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochaix P, Desfontaines D, Puzin C, et al. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jun 1; 31 (11): 2952–62. doi: 10.1093/nar/gkg375.
 40. Boch J. TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol.* 2011 Feb; 29 (2): 135–6. doi: 10.1038/nbt.1767.
 41. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods.* 2013 Oct; 10 (10): 957–63. doi: 10.1038/nmeth.2649.
 42. Boissel S, Jarjour J, Astrakhan A, Adey A, Gouble A, Duchateau P, et al. megaTALS: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 2014 Feb; 42 (4): 2591–601. doi: 10.1093/nar/gkt1224.
 43. Certo MT, Gwiazda KS, Kuhar R, Sather B, Curinga G, Mandt T, et al. Coupling endonucleases with DNA end-processing enzymes to drive gene disruption. *Nat Methods.* 2012 Oct; 9 (10): 973–5. doi: 10.1038/nmeth.2177.
 44. Delacôte F, Perez C, Guyot V, Duhamel M, Rochon C, Ollivier N, et al. High frequency targeted mutagenesis using engineered endonucleases and DNA-end processing enzymes. *PLoS One.* 2013; 8 (1): e53217. doi: 10.1371/journal.pone.0053217.
 45. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014 Nov 28; 346 (6213): 1258096. doi: 10.1126/science.1258096.
 46. Nemudriy AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakiyan SM. Sistemy redaktirovaniya genomov TALEN i CRISPR/Cas — instrumenty otkrytiy. *Acta naturae.* 2014; vol. 6, 3 (22): 20–41.
 47. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014 Aug; 15 (8): 541–55. doi: 10.1038/nrg3763. Epub 2014 Jul 15.
 48. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Feb 6; 93 (3): 1156–60.
 49. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing Off-Target Cleavage Specificities of Zinc Finger Nucleases by in Vitro Selection. *Nat Methods.* 2011 Aug 7; 8 (9): 765–70. doi: 10.1038/nmeth.1670.
 50. Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. *Science.* 2011 Jul 15; 333 (6040): 307. doi: 10.1126/science.1207773.
 51. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science.* 2009 Dec 11; 326 (5959): 1509–12. doi: 10.1126/science.1178811.
 52. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science.* 2009 Dec 11; 326 (5959): 1501. Bibcode:2009Sci...326.1501M. doi:10.1126/science.1178817. PMID 19933106.
 53. Horvath P, Barrangou R (January 2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea". *Science* 327 (5962): 167–70. doi: 10.1126/Science.1179555.
 54. Swarts DC, Mosterd C, van Passel MW, Brouns SJ. CRISPR interference directs strand specific spacer acquisition. *PLoS One.* 2012; 7 (4): e35888. doi: 10.1371/journal.pone.0035888.
 55. Boroviak K, Doe B, Banerjee R, Yang F, Bradley A. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9. *Genesis.* 2016 Feb; 54 (2): 78–85. doi: 10.1002/dvg.22915. Epub 2016 Jan 25.
 56. Yin H, Song CQ, Dorkin JR, Zhu LJ, Li Y, Wu Q, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol.* 2016 Mar; 34 (3): 328–33. doi: 10.1038/nbt.3471. Epub 2016 Feb 1.
 57. End of chemotherapy within 20 years as pioneering DNA project launched. *The Daily Telegraph.* 01.08.2014
 58. Zhu W, Xie K, Xu Y, Wang L, Chen K, Zhang L, Fang J. CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and transgenic mouse. *Virus Res.* 2016 Jun 2; 217: 125–32. doi: 10.1016/j.virusres.2016.04.003. Epub 2016 Apr 2.
 59. Hung SS, McCaughey T, Swann O, Pébay A, Hewitt AW. Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Jun; 53: 1–20. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.05.001. [Epub ahead of print].
 60. Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci Rep.* 2016 Jan 27; 6:19969. doi: 10.1038/srep19969.
 61. Nafissi N, Foldvari M. Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools. *Front Neurosci.* 2015 Oct 14; 9: 355. doi: 10.3389/fnins.2015.00355.
 62. Li Y, Chan L, Nguyen HV, Tsang SH. Personalized Medicine: Cell and Gene Therapy Based on Patient-Specific iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 854: 549–55. doi: 10.1007/978-3-319-17121-0_73
 63. Wu WH, Tsai YT, Justus S, Lee T, Zhang L, Lin CS, et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther.* 2016 May 20. doi: 10.1038/mt.2016.107. [Epub ahead of print].
 64. Mendell JR, Rodino-Klapac LR. Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment. *Cell Res.* 2016 May; 26 (5): 513–4. doi: 10.1038/cr.2016.28. Epub 2016 Mar 1.
 65. Himeda CL, Jones TI, Jones PL. Scalpel or Straitjacket: CRISPR/Cas9 Approaches for Muscular Dystrophies. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Apr; 37 (4): 249–51. doi: 10.1016/j.tips.2016.02.001. Epub 2016 Feb 22.
 66. Iyombe-Engembe JP, Ouellet DL, Barbeau X, Rousseau J, Chapdelaine P, Lagüe P, Tremblay JP. Efficient Restoration of the Dystrophin Gene Reading Frame and Protein Structure in DMD Myoblasts Using the CinDel Method. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016 Jan 26; 5: e283. doi: 10.1038/mtna.2015.58.
 67. Maggio I, Stefanucci L, Janssen JM, Liu X, Chen X, Mouly V, Gonçalves MA. Selection-free gene repair after adenoviral vector transduction of designer nucleases: rescue of dystrophin synthesis in DMD muscle cell populations. *Nucleic Acids Res.* 2016 Feb 18; 44 (3): 1449–70. doi: 10.1093/nar/gkv1540. Epub 2016 Jan 13.
 68. Kawecka K, Theodoulides M, Hasoglu Y, Jarmin S, Kymalainen H, Le-Heron A, et al. Adeno-Associated Virus (AAV) Mediated Dystrophin Gene Transfer Studies and Exon Skipping Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *Curr Gene Ther.* 2015; 15 (4): 395–415.
 69. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015 Feb 18; 6: 6244. doi: 10.1038/ncomms7244.
 70. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Perez-Pinera P, Brown MT, Majoros WH, et al. Correction of dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol Ther.* 2015 Mar; 23 (3): 523–32. doi: 10.1038/mt.2014.234. Epub 2014 Dec 10.
 71. Maggio I, Chen X, Gonçalves MA. The emerging role of viral vectors as vehicles for DMD gene editing. *Genome Med.* 2016 May 23; 8 (1): 59. doi: 10.1186/s13073-016-0316-x.
 72. Reardon S. Gene-editing method tackles HIV in first clinical test. *Nature.* 2014 Mar 05. doi: 10.1038/nature.2014.14813.
 73. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014 Mar 6; 370 (10): 901–10. doi: 10.1056/NEJMoa1300662.
 74. Kaminski R, Bella R, Yin C, Otte J, Ferrante P, Gendelman HE, et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther.* 2016 May 19. doi: 10.1038/gt.2016.41. [Epub ahead of print].
 75. Ueda S, Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Koyanagi Y. Insufficient anti-HIV-1 potency of the CRISPR/Cas9 system for full viral replication. *Microbiol Immunol.* 2016 Jun 9. doi: 10.1111/1348-0421.12395. [Epub ahead of print].
 76. Stone D, Niyonzima N, Jerome KR. Genome editing and the next generation of antiviral therapy. *Hum Genet.* 2016 Jun 8. [Epub ahead of print].
 77. Pernet O, Yadav SS, An DS. Stem cell-based therapies for

- HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 May 2. pii: S0169-409X(16)30137-5. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.027. [Epub ahead of print].
78. Kim M, Siliciano RF. Genome editing for clinical HIV isolates. *Nat Biotechnol.* 2016 Apr 7; 34 (4): 388–9. doi: 10.1038/nbt.3531.
 79. Wang CX, Cannon PM. The clinical applications of genome editing in HIV. *Blood.* 2016 May 26; 127 (21): 2546–52. doi: 10.1182/blood-2016-01-678144. Epub 2016 Apr 6.
 80. Wang Z, Pan Q, Gendron P, Zhu W, Guo F, Cen S, et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep.* 2016 Apr 19; 15 (3): 481–9. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.042. Epub 2016 Apr 7.
 81. Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Mol Ther.* 2016 Mar; 24 (3): 522–6. doi: 10.1038/mt.2016.24. Epub 2016 Jan 22.
 82. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napolitano A, Zhang Yet al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep.* 2016 Mar 4; 6: 22555. doi: 10.1038/srep22555.
 83. Momaya A, Fawal M, Estes R. Performance-enhancing substances in sports: a review of the literature. *Sports Med.* 2015 Apr; 45 (4): 517–31. doi: 10.1007/s40279-015-0308-9.
 84. World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code: The 2015 Prohibited List of International Standards. Montreal (Quebec); 2014 Sep 20. 10 p.
 85. Adis Insight [Internet]. Cham (Switzerland): Springer International Publishing AG; [cited 2016 Jun]. Drug Profile: Erythropoietin gene therapy — Oxford BioMedica. Available from: <http://adisinsight.springer.com/drugs/800017416>.
 86. Barry P. Finding the golden genes. *Science News.* 2008 Jul 18.
 87. Miah A. Genetically Modified Athletes: Biomedical Ethics, Gene Doping and Sport. London; New York: Routledge; 2004. 208 p.
 88. Regalado A. Engineering the Perfect Baby. *MIT Technology Review.* 2015 Mar 5.
 89. Parens E, Knowles LP. Reprogenetics and public policy. Reflections and recommendations. *Hastings Cent Rep.* 2003 Jul–Aug; 33 (4): S1–24.
 90. Pray L. Embryo screening and the ethics of human genetic engineering. *Nature Education.* 2008; 1 (1): 207.
 91. Ahmetov II, Egorova ES, Gabdrakhmanova LJ, Fedotovskaya ON. Genes and Athletic Performance: An Update. *Med Sport Sci.* 2016; 61: 41–54. doi: 10.1159/000445240. Epub 2016 Jun 10.
 92. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* 2015 Apr 3; 348 (6230): 36–3. doi: 10.1126/science.aab1028.
 93. Knapton S. British scientists granted permission to genetically modify human embryos. *The Daily Telegraph.* 2016 Feb 1.

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 НА ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНАХ МЫШИ

Т. В. Димитриева¹✉, Д. А. Решетов¹, В. Е. Жерновков¹, Д. В. Влодавец³, Е. Д. Зотова¹, Т. Г. Ермолкевич^{1,2}, А. В. Дейкин^{1,2}

¹ Marlin Biotech, Москва

² Центр коллективного пользования,
Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

³ Кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, педиатрический факультет,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Генно-модифицированные животные — важный инструмент биомедицинских исследований. Для их получения все чаще используют систему редактирования генома CRISPR/Cas9. С помощью микроинъекции комплекс РНК-гида и белка Cas9 доставляется в оплодотворенную яйцеклетку, из которой впоследствии развивается животное с модификацией в геноме. Как правило, анализ специфичности и эффективности системы в каждом случае проводят после получения потомства с вероятной мутацией. Однако анализ на предимплантационной стадии позволил бы сократить время эксперимента, а также понять причину рождения малого числа или даже отсутствия трансгенных особей в потомстве. В статье предложена модификация метода подготовки тотальной ДНК из бластоцист мыши, позволяющая проще и быстрее детектировать результаты микроинъекций комплекса CRISPR/Cas9 в зиготу. Применив описанный в статье метод, мы успешно идентифицировали короткие делеции в интроне 34 гена дистрофина (*DMD*) в 12 из 13 обработанных эмбрионов и вставку по месту разрыва в интроне 8 гена *DMD* в 11 из 21 проанализированных образцов. Используя приготовленную предложенным способом тотальную ДНК, можно анализировать до 20 различных сайтов в геноме мышинного эмбриона на стадии бластоцисты, не прибегая к полногеномной амплификации.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/Cas9, короткие вставки нуклеотидов, делеции нуклеотидов, эмбрионы мыши, миодистрофия Дюшенна

Благодарности: авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования Института биологии гена РАН за предоставленное для экспериментов оборудование.

✉ Для корреспонденции: Димитриева Татьяна Владимировна
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5; dimitrieva.ta@gmail.com

Статья поступила: 16.06.2016 Статья принята к печати: 21.06.2016

MODIFICATION OF THE METHOD FOR ANALYSIS OF GENOME EDITING RESULTS USING CRISPR/CAS9 SYSTEM ON PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYOS

Dimitrieva TV¹✉, Reshetov DA¹, Zhernovkov VE¹, Vlodavets DV³, Zotova ED¹, Ermolkevich TG^{1,2}, Deykin AV^{1,2}

¹ Marlin Biotech, Moscow, Russia

² Shared Resource Center,
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, Faculty of Pediatrics,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Genetically modified animals are an important tool for biomedical research. The CRISPR/Cas9 editing genome system is increasingly being used for production of such animals. Through microinjection, complex with guide RNA and Cas9 protein is delivered in fertilized eggs from which the animal subsequently develops with a modification in the genome. Generally, analysis of the specificity and efficiency of the system in each case is carried out after obtaining a progeny with the likely mutation. However, analysis at the preimplantation stage would allow reducing the time of the experiment, as well as understanding the reason for the birth of a small number of transgenic animals, or even lack of them in the offsprings. The paper proposes a modification of the method of preparation of total DNA from mouse blastocysts. The modification allows to easier and faster detect the results of microinjection of the CRISPR/Cas9 complex in the zygote. Having applied the method described in this paper, we successfully identified short deletions in intron 34 of dystrophin gene (*DMD*) in 12 out of 13 treated embryos and insertion in the break site in intron 8 of the *DMD* gene in 11 out of 21 samples analyzed. Using for analysis the total DNA prepared by the method proposed, you can analyze up to 20 different sites in the mouse embryo genome at the blastocyst stage without the need for full genomic amplification.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, short nucleotide insertions, nucleotide deletions, mouse embryos, Duchenne muscular dystrophy

Acknowledgement: authors thank the Shared Resource Center of the Institute of Gene Biology of Russian Academy of Sciences for the equipment provided for this research.

✉ Correspondence should be addressed: Tatiana Dimitrieva
ul. Vavilova, d.34/5, Moscow, Russia, 119334; dimitrieva.ta@gmail.com

Received: 16.06.2016 Accepted: 21.06.2016

Генно-модифицированные организмы — незаменимый инструмент для исследования функций генов и некодирующих последовательностей, взаимодействия регуляторных последовательностей в геноме и экспрессии рекомбинантных белков, а также для моделирования заболеваний человека. До недавнего времени получение генно-модифицированных животных являлось очень длительным и дорогостоящим и потому практически недоступным для многих групп ученых, однако все изменилось с появлением новых систем редактирования генома. В 2013 г. была опубликована первая статья о применении системы CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9) — методики, позволяющей в один прием инактивировать несколько генов [1]. Система включает РНК, содержащую регулярные кластеры коротких палиндромных повторов (CRISPR), транс-активирующую РНК и белок Cas9 (нуклеазу). Этот комплекс, который в природе выполняет роль иммунитета бактерий против паразитирующих на них фагов [2], был приспособлен для редактирования ДНК как *in vitro*, так и в клетках млекопитающих [3]. Белок Cas9 эффективно вносит двуцепочечный разрыв в трех нуклеотидах от PAM-сайта (protospacer adjacent motif) — NGG, который расположен сразу за последовательностью, комплементарной РНК-гиду длиной 19 нуклеотидов [4]. На место разрыва клеточная система репарации генома вносит короткие делеции или вставки. При одновременном добавлении конструкций, содержащих последовательности, гомологичные области вокруг разрыва, происходит гомологичная репарация и возможна вставка желаемого фрагмента в геном по определенному сайту [5]. Данный подход используется для вставки экспрессионной кассеты по месту внесения разрыва (knock-in). Открытие системы редактирования генома CRISPR/Cas9 произвело настоящую революцию в получении генно-модифицированных животных, сократив продолжительность экспериментов с нескольких лет до нескольких месяцев. С помощью микроинъекций в pronucleus зиготы комплекса РНК-гида с белком Cas9 уже были получены генно-модифицированные мыши [6, 7], крысы [7], обезьяны [8] и др.

Система CRISPR/Cas9 была неоднократно успешно применена для моделирования заболеваний человека на мышах [9–11]. При создании таких моделей важно провести модификацию в строго определенном сайте, не нарушив работу остальных генов. Проблема неспецифической модификации очень актуальна, и, несмотря на существование множества биоинформатических программ, позволяющих подбирать РНК-гиды к заданным сайтам и оценивать их эффективность и специфичность, остается вероятность внесения нежелательных мутаций по нецелевым (off target, OT) сайтам [6]. Предсказанные OT-сайты, как правило, анализируют на наличие мутаций и делают это уже после рождения трансгенного потомства, т. е. минимум через три недели после проведения микроинъекций, в то время как анализ на стадии бластоцисты позволил бы оценить специфичность вносимых модификаций заранее.

Однако методы, чаще всего используемые для амплификации ДНК предимплантационных эмбрионов, не позволяют проанализировать несколько участков генома [12]. Сейчас для анализа нескольких сайтов в геноме мышинных эмбрионов применяют полногеномную амплификацию перед постановкой полимеразной цепной реакции (ПЦР) или проводят два раунда ПЦР [13]. Такой подход приводит к появлению как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов ввиду низкого содержания ДНК в исходном образце [14], а высокая стоимость реактивов для полногеномной амплификации вынуждает исследователей анализировать меньшее число эмбрионов.

В статье мы описываем метод приготовления тотальной ДНК из одного эмбриона мыши на стадии бластоцисты, который упрощает, ускоряет и удешевляет процесс получения генно-модифицированных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе исследования оценивали эффективность нескольких методов лизиса бластоцист. Эксперименты проводили в трех повторностях с момента получения оплодотворенных яйцеклеток, при этом для каждого метода использовали не менее 20 бластоцист. Параллельно изучали влияние метода подготовки бластоцист к лизису и определяли минимальное количество лизата для амплификации (три эксперимента). Затем проводили эксперименты по анализу эффективности редактирования генома комплексом CRISPR/Cas9 (детекция коротких вставок и делеций, выявление целевой вставки в геном) с использованием метода лизиса, показавшего в предыдущих экспериментах лучший результат. РНК-гиды подбирали для интронов 8 и 34 гена дистрофина (*DMD*), мутации в котором вызывают развитие миодистрофии Дюшенна.

Подбор и синтез РНК-гидов

Подбор РНК-гидов проводили с помощью онлайн-ресурса CHOPCHOP [15]. Для синтеза РНК-гида использовали два частично комплементарных олигонуклеотида — SgR (содержит T7-промотор) и Sg31 (кодирует сайт g31 в геноме) или SgR и Sg34 (кодирует сайт g34 в геноме). Праймеры были синтезированы компанией «Евроген» (Россия), их последовательности представлены в таблице.

Для получения ДНК-матрицы олигонуклеотиды смешивали в эквимольном соотношении и амплифицировали в термоциклере T100 (BioRad, США) по программе: 95 °C — 1 мин; 30 циклов 95 °C — 30 с, 65 °C — 30 с, 72 °C — 30 с; 72 °C — 5 мин, используя набор реагентов GenPack PCR-core kit («Изоген», Россия). Матрицу очищали от продуктов реакции с помощью набора реагентов CleanUp Kit («Евроген», Россия) по протоколу производителя, РНК-гид синтезировали с помощью набора реагентов RiboMax express (Promega, США) и выделяли из реакционной смеси фенол-хлороформной экстракцией с последующим

Последовательности олигонуклеотидов

Название	Последовательность 5'-3'
g31	GTGGCAGACTAGTAGTTTG
g34	GTAAAGACTCGGCAGTTAAG
SgR	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAC
sg31-HDRt	GTAGATAGAATAGTTTATTGGTGATCTCAACCATGGATCCACTACTAGTCTGCCACTGAGAAAAGAGAAG

осаждением в изопропанол [16]. РНК-гид растворяли в воде, свободной от нуклеаз, измеряли концентрацию на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили при -70°C .

Для экспериментов по обнаружению вставки в месте разрыва синтезировали матрицу для репарации — одноцепочечный олигонуклеотид длиной 70 нт, состоящий из двух перекрывающихся сайтов рестрикции для ферментов NcoI и BamHI, окруженных плечами гомологии протяженностью 30 нт с каждой стороны. В PAM-сайт были внесены замены, чтобы предотвратить связывание РНК-гида с матрицей для репарации (sg31-HDRt, последовательность представлена в таблице). Синтез был выполнен компанией «Евроген».

Микроинъекции в пронуклеус зиготы и культивирование эмбрионов

У неполовозрелых самок мышей гибридной линии C57BL6 x CBA весом 12–13 г вызывали суперовуляцию введением сначала 5 ед. гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСКЖ) и затем через 46–48 ч — 5 ед. хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). После инъекции самку сразу подсаживали в клетку к самцу-производителю для спаривания. Овуляция происходила через 11–14 ч после инъекции ХГЧ. Оплодотворенные яйцеклетки вымывали хирургически через 12–13 ч после копуляции (середина темного периода освещения), т. е. через 25–27 ч после инъекции ХГЧ.

Комплекс редактирования генома микроинъекцировали преимущественно в мужской пронуклеус зигот мыши на стадии двух пронуклеусов. Зиготы помещали в камеру, состоящую из двух покровных стёкол, закрепленных одно над другим так, что верхний и нижний край капли среды M2 (MTI-GlobalsStem, США) были плоскими и параллельными. Визуализировали пронуклеусы с помощью дифференциального интерференционно-контрастного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия). Иглы для микроинъекции готовили из стеклянных капилляров G100 (Narishige, Япония) на пуллере P97 (Shutter Instruments, США), капилляры-держатели — из капилляров GD1 (Narishige) на пуллере PC-10 (Narishige) и микрокузнице MF-900 (Narishige).

Для микроинъекций РНК-гид (50 нг/мкл) смешивали с белком Cas9 (0,1 пМ; NEB, Великобритания) в буфере TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,1 mM EDTA) и в зависимости от эксперимента — с матрицей для репарации (3 пМ; «Евроген», Россия). Компоненты смешивали непосредственно перед проведением микроинъекций и инкубировали 5 мин при 37°C для образования комплекса.

После микроинъекции зиготы культивировали в течение 2–3 ч в CO_2 -инкубаторе IGO 150 (Thermo Electron Corporation, Франция) при содержании углекислого газа в воздухе 5 % и 100%-й влажности, затем оценивали их визуально и те из них, что находились в удовлетворительном состоянии, оставляли на 3 дня в KSOM-буфере (MTI-GlobalStem, США) для формирования бластоцист. Культивирование проходило в чашках Петри диаметром 35 мм в каплях объемом 50–60 мкл. Сверху капли покрывали легким минеральным маслом категории embryo tested. Все подготовительные процедуры осуществляли в ламинарном боксе.

Подготовка препарата тотальной ДНК бластоцисты и ПЦР-амплификация целевого фрагмента

Под микроскопом каждый эмбрион в объеме 1 мкл последовательно переносили через 3 капли воды для ПЦР

(«Евроген») с помощью автоматической пипетки и наконечников с фильтрами и помещали в объеме 1 мкл на стенку пробирки объемом 0,2 мл. 1 мкл воды из последней капли использовали в качестве отрицательного контроля для ПЦР. При необходимости на этой стадии образцы замораживали до дальнейшего анализа и хранили при -20°C . Либо использовали неотмытые бластоцисты, для чего переносили эмбрионы в небольшом объеме среды для инкубации (менее 1 мкл) с помощью стеклянного капилляра на стенку пробирки для анализа.

Для лизиса бластоцист использовали несколько методов: непосредственное добавление бластоцисты в маленьком объеме в реакционную смесь, щелочной лизис (200 mM NaOH, 50 mM DTT) [17]; повторное замораживание и размораживание в воде для ПЦР, лизис с лаурилсаркозилем [18]; обработку протеиназой K с детергентом по методике, описанной Sakurai и соавт. [19]. Последний метод модифицировали, исключив из состава буфера дрожжевую tРНК и увеличив объем буфера на образец до 20 мкл. В пробирку добавляли 20 мкл буфера для лизиса, состоящего из протеиназы K (125 мкг/мл), Tris-HCl (100 mM, pH 8,3), KCl (100 mM), желатин 0,02 %, Tween-20 0,45 %. Пробирку инкубировали 10 мин при 56°C , затем — в течение 10 мин при 95°C для инактивации протеиназы. ПЦР-анализ проводили сразу после приготовления образцов или хранили лизат при -20°C .

Целевой регион вокруг сайта узнавания РНК-гида sg31 амплифицировали с помощью праймеров g31-434F (5'-TCAAACAAAAGGCAGAAGAGTAAG-3') и g31-434R (5'-GGTCCAAAGTAGGCCTCGTA-3'), РНК-гида sg34 — с помощью праймеров g34-505F (5'-CAGTGCCCCACACATACA-3') и g34-505R (5'-AGCAAAGTTATTTTAGGGCATACT-3'). В реакцию добавляли от 1 до 10 мкл лизата бластоцист или соответствующего контроля. Для проведения ПЦР использовали набор реагентов GenePack PCR core kit («Изоген», Россия). Программа амплификации: 95°C — 1 мин; 40 циклов 95°C — 30 с, 60°C — 30 с, 72°C — 30 с; 72°C — 5 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем.

Анализ мутаций с помощью эндонуклеазы I фага T7

Короткие делеции и вставки, образующиеся после репарации двуцепочечных разрывов, детектировали с помощью эндонуклеазы I фага T7 (T7EI; NEB, Великобритания). Для этого смешивали ПЦР-продукт с контрольной матрицей, амплифицированной при тех же условиях (по 5 мкл реакционной смеси для каждого фрагмента), и буфером NEB2 (NEB). В конечном объеме 9 мкл проводили отжиг олигонуклеотидов при температуре от 95 до 25°C со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}/\text{сек}$. Далее в каждую пробирку добавляли 0,1 ед. активности фермента. Реакцию проводили 1 ч при 37°C . Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Границы делеций и размеры вставок определяли секвенированием ПЦР-продуктов по Сэнгеру (Центр коллективного пользования «Геном», Россия).

Проверка наличия вставки в геном рестрикцией по сайту BamHI

Одноцепочечный фрагмент ДНК, использованный в качестве матрицы для репарации, кодировал сайты узнавания для двух эндонуклеаз: NcoI и BamHI. ПЦР-продукты,

полученные амплификацией участка 8 интрона инъектированных и контрольных эмбрионов, смешивали с буфером FastDigest Green Buffer 10X и добавляли 0,1 ед. активности фермента BamHI (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию проводили 1 ч при 37 °C. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Наличие вставки подтверждали секвенированием ПЦР-продуктов по Сэнгеру (ЦКП «Геном»).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор методики проведения ПЦР на бластоцистах

В серии экспериментов с использованием различных методов лизиса ПЦР-продукт получили в наибольшем количестве образцов при приготовлении лизата методом, описанным Sakurai и соавт. [19] с модификациями, указанными в методах (результаты не приведены).

Далее было выяснено, что большое значение для воспроизводимости результатов ПЦР имеет подготовка бластоцист к лизису, т. к. компоненты среды могут ингибировать как лизис, так и полимеразу в дальнейшем. В параллельных экспериментах было показано, что при прочих равных условиях перенесение эмбриона в среде для инкубации ухудшает воспроизводимость результатов ПЦР (в среднем 11 успешных реакций на 20 образцов) по сравнению с использованием эмбрионов, отмытых от компонентов среды (20 успешных реакций на 20 образцов). В этом и последующих экспериментах лизис проводили методом Sakurai и соавт. с модификациями.

Чтобы выяснить минимальный объем лизата, который может быть использован в качестве матрицы для амплификации, была проведена соответствующая серия экспериментов. За 40 циклов ПЦР был успешно амплифицирован участок ДНК длиной 434 п. н. с использованием в качестве матрицы от 1 до 10 мкл лизата (рис. 1).

Таким образом, предложенный метод позволяет проанализировать до 20 разных сайтов в геноме мышинного эмбриона на стадии бластоцисты.

Поиск коротких вставок и делеций в сайте g34 гена DMD мышинных эмбрионов после микроинъекций РНК-гида с белком Cas9

В пронуклеус зигот с помощью микроинъекций доставляли РНК-гид sg34 к гену *DMD* с белком Cas9. 13 эмбрионов на стадии бластоцисты лизировали методом Sakurai и соавт. с модификациями. Фрагмент гена *DMD* длиной 505 п. н. амплифицировали, используя в качестве матрицы лизаты инъектированных и контрольных эмбрионов. ПЦР-фрагменты были успешно амплифицированы во всех образцах (результаты не приведены).

Далее ПЦР-фрагменты гибридизовали с контрольным образцом и обрабатывали эндонуклеазой I. В 12 из 13 образцах произошло расщепление на 2 фрагмента длиной 300 п. н. и 250 п. н. (рис. 2, А). Четыре ПЦР-фрагмента были выбраны для проверки наличия мутаций в районе связывания РНК-гида секвенированием по Сэнгеру. Результаты представлены на рис. 2, Б. В образце 1 была обнаружена делеция протяженностью 12 нт (с –5 по +7, где за положение +1 был принят нуклеотид N в триplete NGG PAM-сайта). В образцах 2 и 3 размер делеции составил 17 нт (с –11 по +6), а в образце 4 — 38 нт (с –7 по +31).

Обнаружение вставки после гомологичной рекомбинации по месту разрыва

Одноцепочечный олигонуклеотид sg31-HDRt инъектировали вместе с комплексом РНК-гид sg31/белок Cas9 в пронуклеус зигот. 21 эмбрион на стадии бластоцисты использовали для анализа. Участок интрона 8 гена *DMD* длиной 434 п. н. амплифицировали с инъектированных и контрольных эмбрионов, предварительно лизированных по выбранной методике. ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазой BamHI. Результаты представлены на рис. 3. В 11 из 21 обработанных образцов детектировали частичное или полное расщепление на 2 фрагмента. Образец 2 был короче остальных примерно на 50 нуклеотидов, что свидетельствовало о наличии достаточно большой делеции. Образец 5 был потерян в процессе рестриктного анализа (рис. 3, А). Пять образцов (6, 12, 15, 19 и 20) были выбраны для подтверждения наличия вставки в сайте узнавания sg31 секвенированием по Сэнгеру. Вставка была обнаружена во всех последовательностях. В образцах 6, 15 и 19 помимо копии гена со вставкой также была идентифицирована нормальная копия (рис. 3, Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Чаще всего для определения успешности проведенных манипуляций при получении генно-модифицированных организмов используют ДНК новорожденных потомков [12]. Однако такой подход требует подсадки оплодотворенных эмбрионов после проведения микроинъекций реципиентам и полного или частичного вынашивания потомства, что отнимает большую часть времени, отведенного на эксперимент. Анализ эмбрионов на стадии бластоцисты, описанный нами, позволяет быстро определить, возможно ли получение генно-модифицированных организмов с использованием подобранного РНК-гида. При этом за счет быстрого получения результатов отпадает необходимость в предварительном тестировании РНК-гидов на культурах клеток, а также возможен статистический анализ. В случаях, когда подсадка оплодотворенных яйцеклеток после проведения микроинъекций не приводит к рождению генно-модифицированных потомков, предложенный метод может помочь определить причины эмбриональной гибели путем анализа неспецифических сайтов

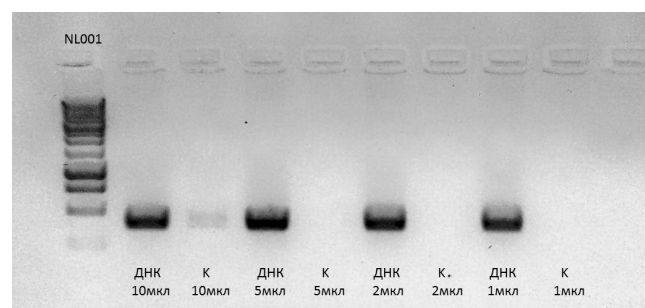


Рис. 1. Амплификация участка интрона 8 гена дистрофина *DMD* с использованием разного количества матрицы

Бластоцисты были лизированы по методу Sakurai и соавт. [19] с модификациями в конечном объеме 20 мкл. Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали от 1 до 10 мкл раствора тотальной ДНК. В качестве контроля к каждому образцу использовали соответствующий объем воды из последней промывки, обработанной аналогичным образом. Продукты ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Маркер длин фрагментов ДНК — NL001 («Евроген», Россия).

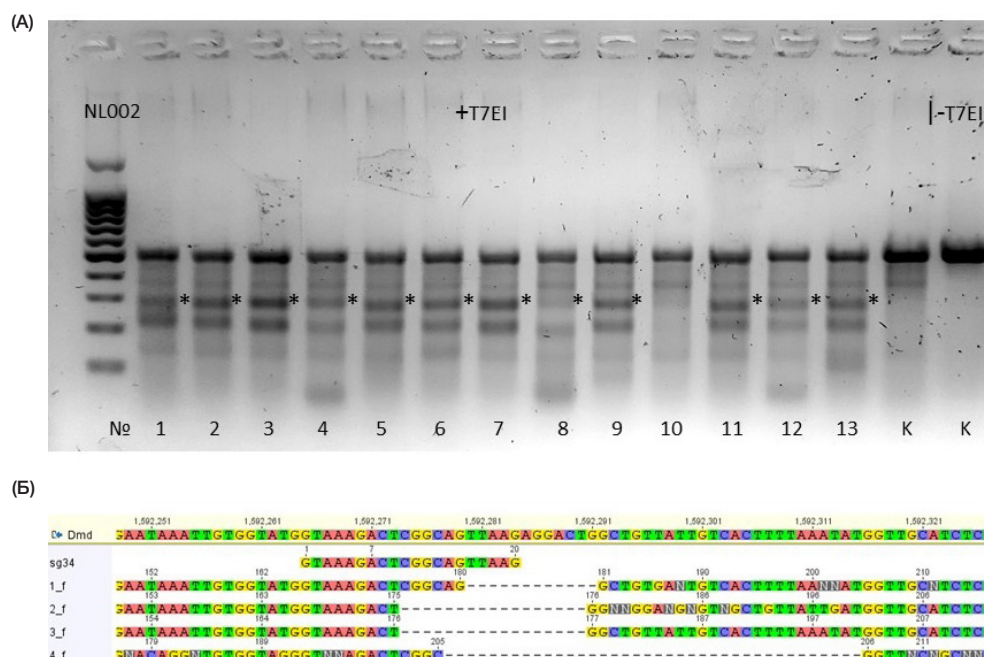


Рис. 2. Детекция вставок и делеций в интроне 34 гена дистрофина DMD после микроинъекций комплекса sg34 с белком Cas9. Фрагмент интрона вокруг сайта узнавания sg34 амплифицировали с инъектированных и контрольных эмбрионов. Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) отжидали на контрольный ампликон и обрабатывали эндонуклеазой I фага T7. В образцах, содержащих вставки и делеции, произошло расщепление на 2 фрагмента. Такие образцы отмечены на рисунке символом * (А). Границы вставок и делеций в выборочных образцах были определены секвенированием по Сэнгеру (Б). Продукты ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Маркер длин фрагментов ДНК — NL002 («Евроген», Россия).

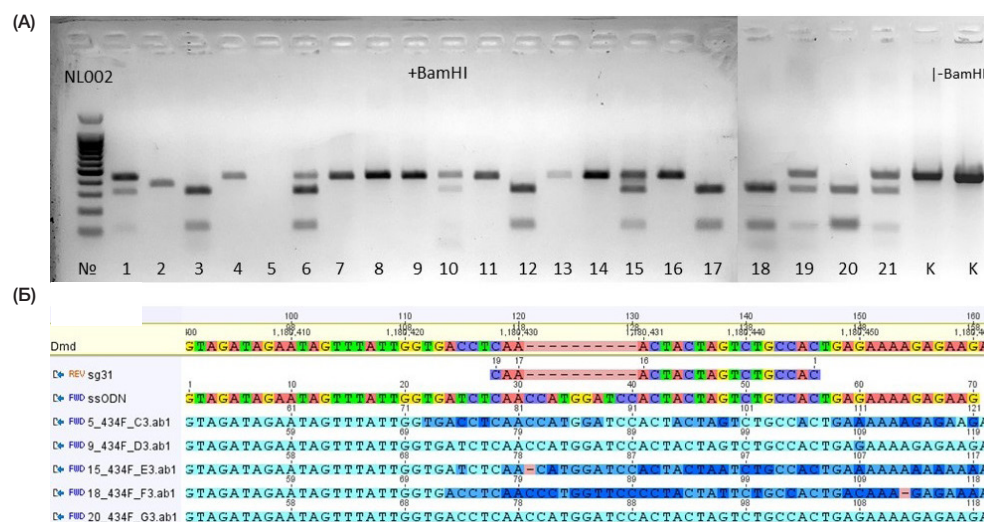


Рис. 3. Детекция вставки по месту разрыва в интроне 8 гена дистрофина DMD после микроинъекций комплекса sg31 с белком Cas9 и матрицей для репарации.

Фрагмент интрона вокруг сайта узнавания sg31 амплифицировали с инъектированных и контрольных эмбрионов. Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) обрабатывали эндонуклеазой BamHI, сайт узнавания которой был закодирован в матрице для репарации. В образцах, содержащих вставку, произошло расщепление на 2 фрагмента. Такие образцы отмечены на рисунке символом * (А). Наличие вставки в выборочных образцах было подтверждено секвенированием по Сэнгеру (Б). Продукты ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Маркер длин фрагментов ДНК — NL002 («Евроген», Россия).

связывания РНК-гида или проверить эффективность комплекса РНК-гида с белком Cas9.

Для клональной селекции характерна проблема недостаточного количества ДНК в исходном материале после трансфекции первичных культур клеток, иммортализованных клеточных линий или стволовых клеток плазмидой, кодирующей нуклеазный комплекс. В этом случае выделение геномной ДНК с помощью коммерческих наборов реагентов дорого и низкоэффективно, в то время как предложенный метод получения тотальной ДНК может

помочь проанализировать большее количество клонов. Это особенно актуально при проведении вставки в геном с помощью матрицы для гомологичной рекомбинации, т. к. эффективность этого процесса значительно ниже в сравнении с образованием коротких делеций или вставок нуклеотидов.

С применением модифицированного метода получения тотальной ДНК из мышинных эмбрионов отпадает необходимость в полногеномной амплификации, использовании большого количества циклов или проведении нескольких

раундов ПЦР. Анализ эмбрионов на стадии бластоцисты не только экономит время и средства исследователя, но также представляется более гуманным в сравнении с постнатальным анализом потомства, поскольку сокращается число животных, вовлекаемых в эксперимент.

Тотальная ДНК, приготовленная предложенным способом из мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, пригодна для анализа коротких делеций или вставок нуклеотидов в сайте разрезания белком Cas9 с помощью эндонуклеазы I из фага T7 и других аналогичных ферментов, а также специфического гидролиза эндонуклеазами рестрикции при наличии соответствующего сайта. Эндонуклеаза I из фага T7 узнает и расщепляет одноцепочечные участки в составе гетеродуплекса. С ее помощью можно детектировать наличие коротких делеций и вставок по месту двуцепочечного разрыва после гибридизации анализируемого фрагмента с контрольным ампликоном. В некоторых работах ставится под сомнение применимость эндонуклеазы I из фага T7 для идентификации коротких делеций или вставок нуклеотидов в мышинных эмбрионах [7, 12]. Используя описанный метод подготовки проб, T7EI и секвенирование по Сэнгеру, мы обнаружили высокую эффективность внесения модификаций системой CRISPR/Cas9 в геном мыши с помощью одного РНК-гида, что согласуется с ранее полученными результатами [1]. Таким образом, было установлено, что амплификация целевого фрагмента с одной бластоцисты с последующей обработкой эндонуклеазой I из фага T7 — надежный метод обнаружения мутаций после микроинъекций РНК-гида с белком Cas9 в оплодотворенную яйцеклетку. Было показано, что метод

подготовки образцов тотальной ДНК из одной бластоцисты пригоден для обнаружения вставок по месту разрыва с помощью рестрикционного анализа. Также мы увидели, что гомологичная рекомбинация по сайту узнавания РНК-гида происходит с меньшей эффективностью, чем неомологичное соединение концов при двуцепочечном разрыве (11/21 против 12/13).

ВЫВОДЫ

В статье описана модификация метода получения тотальной ДНК из мышинных эмбрионов на ранней стадии развития и показано, что большое значение имеет не только правильно подобранная методика лизиса, но и процесс пробоподготовки. Предложенный метод отличается от применяемых в настоящее время простотой и отсутствием необходимости в редких и дорогостоящих реагентах. Используя в качестве матрицы лизат эмбриона на стадии бластоцисты, можно амплифицировать необходимый фрагмент ДНК в один раунд ПЦР, существенно снижая риск искажения результатов и контаминации. При этом компоненты смеси не ингибируют ПЦР и ферментативные реакции, и метод позволяет проанализировать независимо друг от друга до 20 различных фрагментов мышинного генома.

Предложенная модификация метода анализа может быть полезна для амплификации участков ДНК после использования других систем редактирования генома, таких как TAL-эффекторные нуклеазы или нуклеазы по типу цинковых пальцев.

Литература

- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013; 153 (4): 910–8.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337 (6096): 816–21.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339 (6121): 819–23.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013; 339 (6121): 823–6.
- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013; 154 (6): 1370–9.
- Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013; 3: 3355.
- Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013; 31 (8): 681–3.
- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014; 156 (4): 836–43.
- Mou H, Kennedy Z, Anderson DG, Yin H, Xue W. Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9. *Genome Med*. 2015; 7 (1): 53.
- Carroll KJ, Makarewich CA, McAnally J, Anderson DM, Zentilin L, Liu N, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (2): 338–43.
- Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol*. 2014; 32 (9): 941–6. doi: 10.1038/nbt.2951.
- Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41 (20): e187. doi: 10.1093/nar/gkt772. Epub 2013 Aug 30.
- Sakurai T, Watanabe S, Kamiyoshi A, Sato M, Shindo T. A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnol*. 2014; 14: 69. doi: 10.1186/1472-6750-14-69.
- Hou Y, Wu K, Shi X, Li F, Song L, Wu H, Dean M, et al. Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing. *Gigascience*. 2015; 4: 37. doi: 10.1186/s13742-015-0068-3.
- Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42 (Web server issue): W401–7.
- Green MR, Sambrook J. Extraction, Purification, and Analysis of RNA from Eukaryotic Cells. In: Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
- Peciña A, Lozano Arana MD, García-Lozano JC, Borrego S, Antiñolo G. One-step multiplex polymerase chain reaction for preimplantation genetic diagnosis of Huntington disease. *Fertil Steril*. 2010; 93 (7): 2411–2.
- Tsuchiya S, Sueoka K, Matsuda N, Tanigaki R, Asada H, Hashiba T, et al. The “Spanning Protocol”: A new DNA extraction method for efficient single-cell genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet*. 2005; 22 (11–12): 407–14.
- Sakurai T, Kamiyoshi A, Watanabe S, Sato M, Shindo T. Rapid zygosity determination in mice by SYBR green real-time genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Res*. 2008; 17 (1): 149–55. Epub 2007 Sep 13.

References

1. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013; 153 (4): 910–8.
2. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337 (6096): 816–21.
3. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339 (6121): 819–23.
4. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013; 339 (6121): 823–6.
5. Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013; 154 (6): 1370–9.
6. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013; 3: 3355.
7. Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013; 31 (8): 681–3.
8. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014; 156 (4): 836–43.
9. Mou H, Kennedy Z, Anderson DG, Yin H, Xue W. Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9. *Genome Med*. 2015; 7 (1): 53.
10. Carroll KJ, Makarewich CA, McAnally J, Anderson DM, Zentilin L, Liu N, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (2): 338–43.
11. Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol*. 2014; 32 (9): 941–6. doi: 10.1038/nbt.2951.
12. Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41 (20): e187. doi: 10.1093/nar/gkt772. Epub 2013 Aug 30.
13. Sakurai T, Watanabe S, Kamiyoshi A, Sato M, Shindo T. A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnol*. 2014; 14: 69. doi: 10.1186/1472-6750-14-69.
14. Hou Y, Wu K, Shi X, Li F, Song L, Wu H, Dean M, et al. Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing. *Gigascience*. 2015; 4: 37. doi: 10.1186/s13742-015-0068-3.
15. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42 (Web server issue): W401–7.
16. Green MR, Sambrook J. Extraction, Purification, and Analysis of RNA from Eukaryotic Cells. In: Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
17. Peciña A, Lozano Arana MD, García-Lozano JC, Borrego S, Antiñolo G. One-step multiplex polymerase chain reaction for preimplantation genetic diagnosis of Huntington disease. *Fertil Steril*. 2010; 93 (7): 2411–2.
18. Tsuchiya S, Sueoka K, Matsuda N, Tanigaki R, Asada H, Hashiba T, et al. The “Spanning Protocol”: A new DNA extraction method for efficient single-cell genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet*. 2005; 22 (11–12): 407–14.
19. Sakurai T, Kamiyoshi A, Watanabe S, Sato M, Shindo T. Rapid zygosity determination in mice by SYBR green real-time genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Res*. 2008; 17 (1): 149–55. Epub 2007 Sep 13.

АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ДЕЛЕЦИЙ В ГЕНЕ ДИСТРОФИНА В КОНТЕКСТЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОПУСКА ЭКЗОНОВ КАК МЕТОДА ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ДИСТРОФИНОПАТИЙ

Е. Д. Зотова^{1,2} ✉, Д. А. Решетов¹, В. Е. Жерновков¹, Д. В. Влодавец³, Т. В. Димитриева¹, А. В. Дейкин^{1,2}

¹ Marlin Biotech, Москва

² Центр коллективного пользования,
Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

³ Кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, педиатрический факультет,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — распространенное наследственное заболевание, развивающееся вследствие мутации в гене дистрофина и приводящее к смерти в детском возрасте. На момент написания статьи пациентам была доступна только поддерживающая терапия, однако подходы к лечению МДД активно разрабатываются, и перспективным является метод пропуска экзонов. Его суть заключается в восстановлении рамки считывания гена путем индукции альтернативного сплайсинга. В результате синтезируется укороченный дистрофин, который в той или иной степени сохраняет функциональность. В работе дана оценка функциональности укороченных форм дистрофина, получающихся при коррекции нонсенс-мутаций и внутриэкзонных инделов по методике пропуска экзонов. Оценка производилась по данным о фенотипе носителей мутаций в гене дистрофина, взятых из базы LOVD (Leiden Open Variation Database). Было обнаружено, что одни и те же мутации способны проявляться как различные фенотипы, что, возможно, объясняется разным генетическим фоном пациентов. Так, делеция экзона 48, для которой в LOVD есть 97 записей, в 2 % случаев приводила к бессимптомному течению заболевания, в 60 % — к миодистрофии Дюшенна, в 12 % — к миодистрофии Беккера (отличается более мягкой симптоматикой, чем МДД), в 26 % случаев — к промежуточному фенотипу. Высокая фенотипическая вариабельность мутаций в гене дистрофина ставит вопрос о границах применения методики пропуска экзонов для терапии наследственных миопатий.

Ключевые слова: мышечная дистрофия, миодистрофия Дюшенна, миодистрофия Беккера, пропуск экзонов

Благодарности: авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования Института биологии гена РАН за предоставленное для экспериментов оборудование.

✉ **Для корреспонденции:** Зотова Евгения Дмитриевна
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5; zotova@fbb.msu.ru

Статья поступила: 17.06.2016 Статья принята к печати: 24.06.2016

ANALYSIS OF PHENOTYPE EXPRESSIONS OF DELETIONS IN THE DYSTROPHIN GENE IN TERMS OF EFFICIENCY OF EXON SKIPPING AS A METHOD FOR TREATMENT OF HEREDITARY DYSTROPHINOPATHIES

Zotova ED^{1,2} ✉, Reshetov DA¹, Zhernovkov VE¹, Vlodavets DV³, Dimitrieva TV¹, Deykin AV^{1,2}

¹ Marlin Biotech, Moscow, Russia

² Shared Resource Center,
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, Faculty of Pediatrics,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a common genetic disease caused by a mutation of the dystrophin gene. It leads to death in childhood. At the time of writing this paper, patients had access to supportive therapy only. However, DMD treatment methods are actively being developed. Exon skipping is a promising method. Exon skipping involves restoration of the reading frame within a gene by inducing alternative splicing. This leads to synthesis of truncated but still functional dystrophin. The paper assesses the functionality of the truncated forms of dystrophin resulting from correction of nonsense mutations and internal exon indels by exon-skipping technique. The assessment was made based on data on the phenotype of carriers of mutations in the dystrophin gene taken from the Leiden Open Variation Database (LOVD). It was revealed that the same mutation could manifest itself as a variety of phenotypes. This, perhaps, is as a result of the patients having different genetic background. For example, deletion of exon 48, for which there is 97 records in LOVD, resulted in asymptomatic diseases in 2 % of cases, Duchenne muscular dystrophy in 60 %, Becker muscular dystrophy (characterized by milder symptoms than DMD) in 12 % and intermediate phenotype in 26 % of cases. High phenotypic variability of mutations of the dystrophin gene raises the issue of limits of applying exon skipping for treatment of inherited myopathies.

Keywords: muscular dystrophy, Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, exon skipping

Acknowledgement: authors thank the Shared Resource Center of the Institute of Gene Biology of Russian Academy of Sciences for the equipment provided for this research.

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgeniya Zotova
ul. Vavilova, d. 34/5, Moscow, Russia, 119334; zotova@fbb.msu.ru

Received: 17.06.2016 Accepted: 24.06.2016

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — рецессивное, сцепленное с X-хромосомой наследственное заболевание, которое поражает примерно 1 из 3600 новорожденных-мальчиков и является наиболее распространенным наследственным заболеванием, приводящим к смерти в детском возрасте [1, 2]. При МДД может происходить поражение скелетной, сердечной и гладкомышечной мускулатуры, пищеварительной и выделительной систем, причем скелетная мускулатура поражается в первую очередь. Помимо прогрессирующей мышечной слабости у пациентов наблюдается задержка в развитии, проблемы с дыханием и речью и сердечная недостаточность [3]. При постановке диагноза в среднем в возрасте 5 лет уже к 13 годам более 95 % пациентов оказываются прикованными к инвалидному креслу, а средний возраст, в котором умирает больной, не получавший специального лечения, составляет 19 лет [4].

Так как МДД является X-сцепленной патологией, ей страдают в большинстве случаев мужчины, которые являются гемизиготами по X-хромосоме. Болезнь обычно передается сыну от матери-носителя вместе с X-хромосомой, однако также может возникать *de novo* в результате мутации в гене дистрофина (*DMD*) [5]. Ген дистрофина считается самым длинным в геноме человека (2,4 млн пар нуклеотидов [6]) и насчитывает 79 экзонов, а кодируемый им белок содержит около 3700 аминокислотных остатков [7]. Время синтеза мРНК дистрофина составляет около 16 ч [8].

Дистрофин — это структурный белок, который входит в состав костамера, белкового комплекса, отвечающего за соединение актомиозиновых комплексов (саркомеров), плазматической мембраны мышечного волокна (сарколеммы) и белков внеклеточного матрикса [9]. Дистрофин имеет вытянутую форму и одним своим концом крепится к актину, а другим — к мембранному дистрогликановому комплексу, также заякоренному к белку цитоскелета спектрину изнутри и белкам внеклеточного матрикса снаружи клетки.

В отсутствие дистрофина комплексы ассоциированных с ним белков теряют свою стабильность. Известно, что в состав костамеров входят два белковых комплекса: дистрофин-гликопротеиновый и интегрин-винкулин-талиновый, по-видимому, выполняющие сходные функции. Повреждения различных звеньев этой сложной и не до конца изученной системы могут приводить к наследственным миопатиям различных типов [10, 11]. Однако, по-видимому в силу сложного строения системы и дублирования белками костамеров функций друг друга, даже полное отсутствие экспрессии дистрофина, приводящее к МДД, не полностью нарушает связь между акто-миозиновыми комплексами, мембраной и внеклеточным матриксом, а лишь сильно ослабляет ее прочность. Из-за этого хрупкая сарколемма подвергается механическим повреждениям при сокращении. Потеря целостности сарколеммы приводит к некрозу мышечных волокон и воспалению. В первые годы жизни больного его мышечные волокна регенерируют за счет пула миосателлитов — стволовых клеток мышечного дифферона. Однако пул миосателлитов постепенно истощается, что приводит к дегенерации мышц и фиброзу [12].

Дистрофин человека содержит 4 структурных домена: N-концевой актин-связывающий домен; центральный домен, содержащий 24 спекtrin-подобных повтора и 4 «шарнирных» участка; цистеин-богатый домен, связывающий β -дистрогликан, и C-концевой домен, связывающий дистробревины и синтрофины. Центральный домен име-

ет сильно вытянутую форму, и, поскольку каждый спекtrin-подобный повтор состоит из трех α -спиралей, по-видимому, является достаточно гибким и эластичным [12]. По данным анализа известных мутантов, небольшое изменение числа спектриновых повторов, в результате не нарушающих рамку считывания делеций, не сильно сказывается на нормальной работе белка [13].

Обычно к возникновению МДД приводит сдвиг рамки считывания в гене дистрофина, вызывающий преждевременную терминацию трансляции и нонсенс-опосредованный распад мРНК, нонсенс-мутации, а также крупные делеции в участках гена, кодирующие N- и C-концы дистрофина, в результате чего полностью нарушается связывание либо с актином, либо с мембранным комплексом дистрогликанов. Среднего же размера делеции в середине гена, не нарушающие рамки считывания, обычно связаны с другой миопатией: мышечной дистрофией Беккера (МДБ), симптомы которой гораздо менее тяжелые: многие пациенты сохраняют способность к самостоятельному передвижению и в зрелом возрасте [14].

Разрабатывается ряд методов лечения МДД, которые направлены не только на подавление воспаления и фиброза и снижение токсического эффекта избытка кальция в цитоплазме, но и на восстановление экспрессии дистрофина [15]. Один из наиболее перспективных — пропуск экзонов (*exon skipping*). Суть метода заключается в том, что с помощью природных олигонуклеотидов или их синтетических аналогов можно исключить некоторые экзоны из зрелой мРНК в ходе сплайсинга за счет стерических помех в работе сплайсосомы. Таким образом, при наличии сдвигающей рамку считывания делеции или нонсенс-мутации с помощью исключения одного или нескольких экзонов можно добиться того, чтобы вся последующая часть гена транслировалась в правильной рамке [16]. Трансляция неполного, но сохраняющего хотя бы частичную функциональность белка, может значительно улучшить состояние пациентов с МДД, особенно если лечение было начато в раннем возрасте [1].

Одно из первых исследований по коррекции МДД методом пропуска экзонов провели с участием четырех пациентов, носителей гена дистрофина с нарушающей рамку считывания делецией одного или нескольких экзонов: 50, 52, 49–50 и 48–50. Во всех четырех случаях индукция пропуска 51-го экзона теоретически восстанавливала рамку считывания гена. Лечение проводили путем внутримышечных инъекций антисенс-олигонуклеотидов, и хотя эффективность пропуска экзонов составила 46–90 %, показатели стандартных физиологических тестов не улучшились [17].

Тем не менее, по оценке Aartsma-Rus и van Ommen [18], пропуск экзонов может помочь большинству пациентов с МДД. Исключения будут составлять мутации, расположенные между экзонами 64 и 70, которые, по-видимому, являются необходимыми для функционирования дистрофина, а также делеции, разрушающие актин-связывающие домены в N-концевой области или затрагивающие первый или последний экзон, и крупные хромосомные перестройки вроде транслокаций. Однако вышеперечисленные мутации достаточно редки и вместе составляют менее 10 % от всех описанных мутаций в гене дистрофина. Таким образом, теоретически примерно у 90 % пациентов с МДД экспрессию функционального или частично функционального белка можно восстановить при помощи пропуска экзонов.

Предсказание и анализ эффективности терапии методом пропуска экзонов является важной прикладной

задачей, т. к. из-за большого размера гена частота мутаций в нем весьма велика и примерно каждый третий пациент обладает *de novo* мутацией [13]. Важным теоретическим аспектом применимости метода является оценка функциональности форм дистрофина, укороченного в результате пропуска экзонов. Именно такая оценка являлась целью данной работы. Для ее проведения следовало определиться с тем, какие мутации можно проанализировать, как их можно корректировать (т. е. пропуск каких экзонов приведет к восстановлению экспрессии дистрофина) и какие методы анализа фенотипического проявления мутаций можно использовать. Мы изучили и обобщили литературные данные по этим аспектам исследования.

Самый простой случай для коррекции гена *DMD* — это наличие нонсенс-мутаций или приводящих к сдвигу рамки считывания вставок и делеций (инделов) в пределах одного экзона. Теоретически такие мутации можно корректировать путем пропуска одного или группы соседних экзонов, удаление которых из зрелой мРНК не приведет к сдвигу рамки считывания. При этом могут быть пропущены не более 7 экзонов — именно столько метод позволяет не включать в зрелую мРНК без потери эффективности [18].

Из 79 экзонов гена дистрофина 34 можно удалить без нарушения рамки считывания, а мутации еще в 29 корректируют удалением самого экзона вместе с одним из соседних. Причем для восьми экзонов из этих 29 совместно удаляемым может быть как предшествующий, так и следующий экзон (рис. 1). Ошибки в оставшихся четырнадцати экзонах корректируют удалением большего числа экзонов: экзоны 6–8 без сдвига рамки считывания удаляют только вместе, также как и экзоны 76–78; экзоны 61 и 71 удаляют только с двумя предшествующими, а экзон 67 — с двумя соседними; экзоны 72 и 73 — только вместе со всеми предшествующими вплоть до 69-го (четыре и пять экзонов соответственно); экзон 74 можно удалить по тому же принципу или же в составе блока экзонов 70–75 (шесть экзонов в обоих вариантах), а экзон 75 — только с пятью предыдущими. Для коррекции экзона 2 требуется удаление шести экзонов, однако, по данным Wein и соавт. [19],

делеция экзона 2 приводит к бессимптомному или очень слабому течению заболевания, т. к. трансляция начинается с внутреннего сайта посадки рибосомы в экзоне 5, и в этом случае укороченный дистрофин сохраняет функциональность. Коррекция же мутаций в первом и последнем экзонах считается невозможной (хотя в свете наличия внутреннего сайта посадки рибосомы в экзоне 5 это может оказаться неверно). Таким образом, теоретически мутации в 75 экзонах можно скорректировать пропуском не более шести экзонов, что соответствует оговоренному ограничению метода пропуска экзонов.

Число возможных коррекций простых одиночных замен, вставок или делеций в гене дистрофина чрезвычайно велико, и экспериментальная проверка всех комбинаций на животных моделях вряд ли представляется возможной. Кроме того, даже на мышах не удастся хорошо воспроизвести человеческий фенотип МДД [20]. Более реальным подходом к решению поставленной задачи является анализ большого массива клинических данных пациентов с мутациями в гене дистрофина, приводящими к МДД или МДБ. Получение достаточной выборки по литературным источникам — это трудоемкий процесс, осложняемый тем, что не для всех мутаций есть опубликованные данные. К счастью, существуют базы данных генетических вариаций. Одна из них, LOVD (Leiden Open Variation Database — Лейденская открытая база генетических вариаций) [21], содержит записи о различных мутациях в гене дистрофина, информацию о половой и популяционной принадлежности их носителей, методе, которым был выполнен анализ и, что наиболее ценно, данные о фенотипе, к которому приводит та или иная мутация у конкретного пациента: МДД, МДБ или бессимптомное течение. Пользователи со всего мира могут самостоятельно пополнять LOVD, что является как достоинством (обширность данных), так и недостатком (потенциально большое количество ошибок) базы. По состоянию на июнь 2016 г. LOVD содержит более 16 000 неunikальных записей о мутациях в гене дистрофина, затрагивающих целиком один или несколько экзонов. Среди них 83 % составляют делеции.

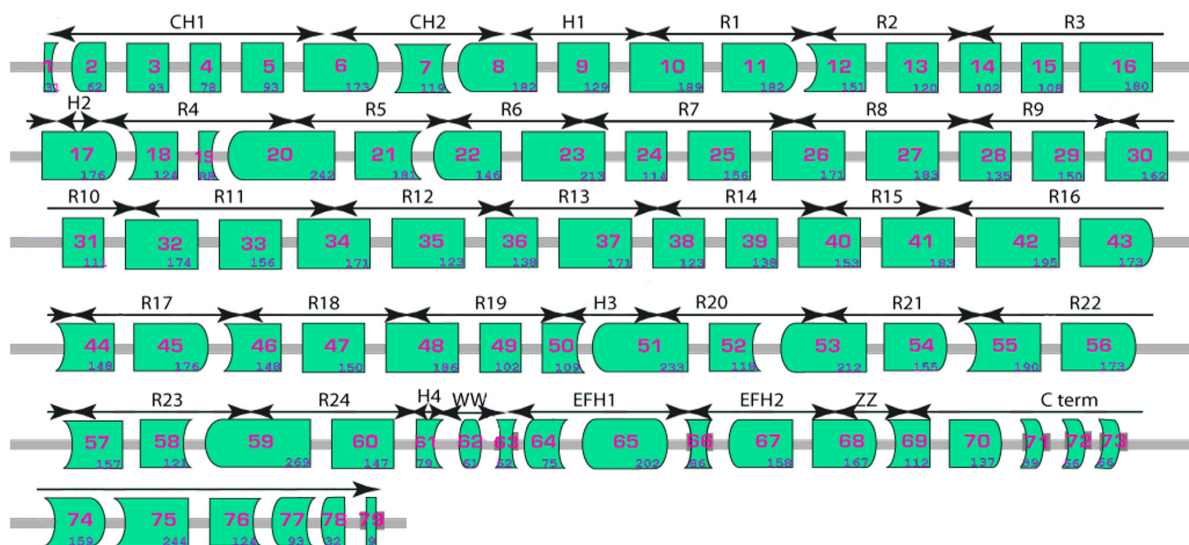


Рис. 1. Экзонная структура гена дистрофина

Зелеными блоками показаны экзоны; справа внизу указан размер экзона (в парах нуклеотидов), а в середине — его порядковый номер. Три вида стыков (прямые, вогнутые и выпуклые) соответствуют трем рамкам считывания, в которые попадают границы экзонов. Стрелками отмечены границы участков гена, кодирующих структурные домены дистрофина: CH1 и CH2 — элементы N-концевого актин-связывающего домена, R1-R24 и H1-H4 — спектринные повторы и «шарнирные» участки центрального домена соответственно, WW, ZZ, EFH1 и EFH2 — структурные элементы домена, богатого цистеином, и C term — уникальный для дистрофина и его гомологов C-концевой домен (Nicolas и соавт., 2012 [29]).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные о мутациях находили при помощи встроенного текстового поиска LOVD [22]. Поисковый запрос вводили в поле Exon. Его составляли в соответствии с номенклатурой базы данных: для экзона N — N-1i_Ni, что означает, что мутация должна затрагивать соседние с экзоном интроны. Например, для поиска делеции экзона 3 составляли запрос 2i_3i. Для делеции группы экзонов запрос осуществляли аналогично. Для анализа брали только записи, содержащие информацию о полных делециях целевых экзонов (экзонов, с помощью которых можно корректировать нонсенс-мутации или внутриэкзонные инделы). Из полученного списка исключали дубликации, а также мутации, носителями которых являлись женщины.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Соотношение фенотипов, соответствующих выбранным для коррекции рамки считывания комбинациям экзонов, представлено на рис. 2. Для 25 делеций в LOVD не нашлось ни одной записи, причем большая часть таких делеций находится в области центрального домена, а также в районе экзонов 65–78. Лишь у 11 комбинаций количество найденных в базе данных случаев превышало 5. Распределение этих 11 комбинаций по доменам дистрофина крайне неравномерно: 7 из них относятся к комбинациям, корректирующим экзоны 45–55 (С-концевая часть центрального домена), еще одна — делеция экзона 13 — затрагивает N-концевую часть центрального домена, а 3 перекрывают N-концевой актин-связывающий домен.

Среди всех представленных в базе данных случаев, соответствующих выбранным делециям, в 45 % регистрируют МДБ или отсутствие симптомов заболевания, тогда как крупные делеции экзонов, приводящие к сдвигу рамки считывания, реализуются как МДБ менее чем в 4 % случаев, что говорит о более мягком течении мышечной дистрофии у пациентов с не нарушающими рамку считывания делециями.

Было также обнаружено, что одни и те же мутации способны проявляться как различные фенотипы. Так, делеция экзона 48, которая встречается в базе данных 97 раз, может протекать бессимптомно (2 % случаев) или приводить к МДБ (60 % случаев), МДД (12 % случаев) или промежуточному фенотипу (26 % случаев). Еще любопытнее делеции экзонов 50–51 и 51–52, для которых описаны 14 и 11 случаев соответственно: если для первой количество случаев бессимптомного течения заболевания или МДБ составляет 6 (43 %), то для второй — ни одного, хотя обе делеции не затрагивают ничего, кроме «шарнирного» участка и одного из спектриновых повторов центрального домена, и, казалось бы, не должны оказывать значимого влияния на структуру белка. Другой часто встречающейся делецией (13 случаев), не нарушающей рамку считывания и не затрагивающей ничего, кроме спектринового повтора, но при этом в 100 % случаев проявляющейся как МДД или смешанный фенотип, является делеция экзона 47.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Количество записей о пациентах-носителях различных делеций в базе данных достаточно сильно варьирует. Причиной этого могут быть как неодинаковая частота мутаций

в разных участках гена, так и недопредставленность какой-либо группы мутаций в базе данных. Действительно, такое распределение вполне можно объяснить наличием описанных в литературе «горячих точек» мейотической рекомбинации в районе экзонов 7 и 44 [23]. Отсутствие же информации о делециях в области центрального домена можно объяснить в основном бессимптомным течением заболевания при таких делециях, что, скорее всего, сильно снижает вероятность обнаружения таких мутаций. Однако необычным является тот факт, что в базе данных не представлена ни одна из комбинаций для коррекции мутаций в экзонах 65–78. Одним из объяснений может служить большой размер перекрывающихся С-конец комбинаций по сравнению с остальными.

По данным Aartsma-Rus и соавт. [24], 91 % мутаций в базе данных LOVD подчиняются следующему правилу: мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания и трансляции укороченного нефункционального дистрофина, являются причиной МДД, а мутации, не приводящие к сдвигу рамки считывания, обычно почти не отражаются на функциональности дистрофина и вызывают МДБ, если не затрагивают ключевых для работы белка доменов, расположенных на его N- и С-концах.

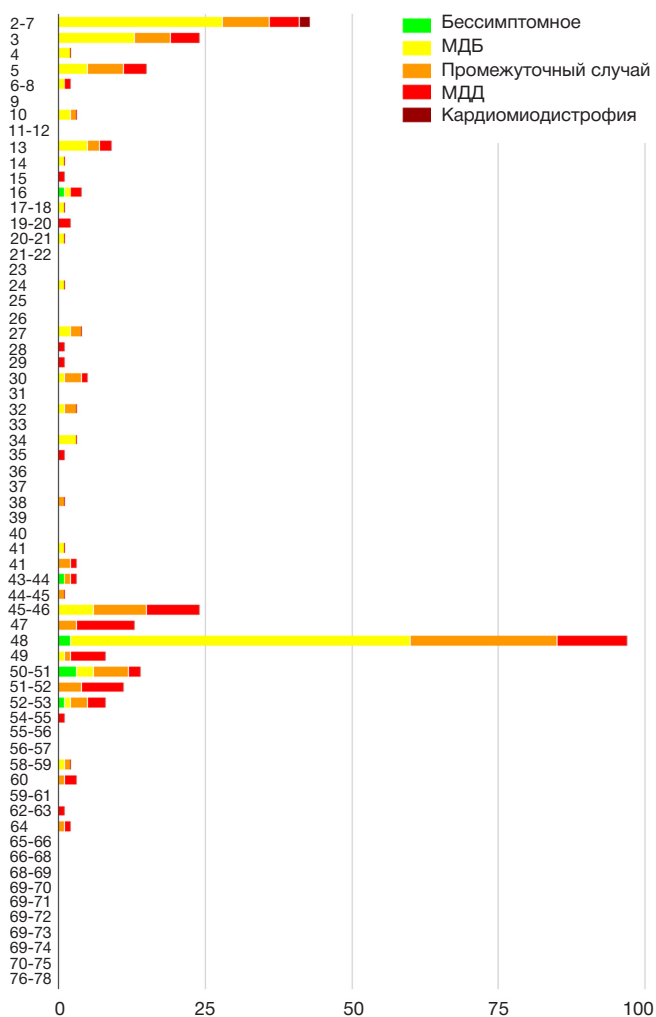


Рис. 2. Распределение фенотипических проявлений делеций в гене дистрофина при пропуске экзонов для восстановления рамки считывания (по данным базы LOVD)

По вертикальной оси отмечены номера экзонов, которые вошли в делецию, по горизонтальной — число содержащихся в базе данных LOVD записей с упоминанием делеции. Секции горизонтальных столбиков соответствуют представленности отдельных фенотипов.

Подтверждением этого правила, по-видимому, является случай, описанный в статье Passos-Bueno и соавт. [25]. В работе речь идет о пациенте с МДБ, которую вызывает крупная не нарушающая рамку считывания делеция (с 13-го по 48-й экзоны). Эта делеция захватывает 18 из 24 спектральных повторов центрального домена, но не трогает N- и C-концы. От всей аминокислотной последовательности белка остается примерно половина, чего, по мнению авторов работы, достаточно для частичного выполнения дистрофином своей функции. Однако из этого правила есть интересные исключения. Например, в работе Takeshima и соавт. [26] описывается случай крупной N-концевой делеции (с 3-го по 41-й экзоны), не нарушающей рамку считывания, которая проявляется в форме промежуточного фенотипа между МДД и МДБ. Отсутствие N-концевого домена делает дистрофин нефункциональным, тем не менее, фенотип пациента не соответствует классической картине течения МДД.

Другим исключением является описываемая в работе Suminaga и соавт. [27] нонсенс-мутация в экзоне 76, которая приводит к синтезу укороченной формы дистрофина, обнаруживаемой иммуногистохимически на препаратах из биоптата мышц. При этом за исключением повышенного уровня креатинфосфаткиназы в крови (что является одним из основных маркеров МДД и МДБ) других симптомов мышечной дистрофии у пациента не выявлено. Авторы работы пишут, что не могут как-либо объяснить полученную картину: другая описанная в литературе нонсенс-мутация, которая обрезает белок лишь на 10 аминокислот ближе к началу, чем найденная в работе, приводит к типичной картине течения МДД [28]. В работе были проверены разные предположения о возможных причинах такого фенотипа: соматический мозаицизм, восстановление рамки считывания из-за альтернативного сплайсинга, компенсаторный высокий уровень экспрессии утробина, белка-гомologa дистрофина, однако все они были отвергнуты.

Как видно из анализа базы данных и перечисленных выше случаев, одни и те же мутации в гене дистрофина могут приводить к различным фенотипам. Причины этого явления до конца не ясны, но, вероятно, его можно объяснить разным генетическим фоном пациентов. Это проблема, т. к. даже если у пациента удастся вызвать эффективный пропуск экзона или экзонов, приводящий к восстановлению рамки считывания, и будет наблюдаться синтез укороченного дистрофина, нет гарантий, что его состояние улучшится. Кроме того, из-за недостаточной изученности

проблемы не существует достоверной методики предсказания того, поможет ли восстановление рамки считывания конкретному пациенту. Статистический анализ в данном случае также затруднен, поскольку лишь для небольшого числа делеций достаточно фенотипических данных.

В нашей работе не были рассмотрены некоторые варианты укороченных дистрофинов, получаемых при коррекции методом пропуска экзонов более сложных для анализа мутаций: крупных делеций, затрагивающих минимум один экзон целиком и вызывающих сдвиг рамки считывания, и дупликаций одного или нескольких экзонов. Часть из них может быть скорректирована пропуском тех же экзонов, что и в случае с внутриэкзонными мутациями, например дупликации экзонов, делеция которых не вызывает сдвиг рамки считывания, или делеции одного экзона, которые могут быть скорректированы пропуском соседнего. Так, дупликация экзона 13 при пропуске обеих копий экзона сведется к делеции экзона 13, а делеция экзона 51 может быть скорректирована пропуском экзона 50 или экзона 52. Коррекция некоторых дупликаций двух и более экзонов и крупных, приводящих к сдвигу рамки считывания и затрагивающих два и более экзона делеций также осуществима. Так, делеция с 7-го по 34-й экзон может быть скорректирована пропуском 6-го. Полученная делеция не будет нарушать рамку считывания, однако неизвестно, будет ли такая форма дистрофина функциональной, а данные в LOVD о подобной мутации отсутствуют. В итоге решено было не проводить детальный анализ таких мутаций из-за большого количества комбинаций и недостатка данных о функциональности получающихся в результате их коррекции форм дистрофина.

ВЫВОДЫ

Проведенный в работе анализ данных о фенотипических проявлениях мутаций в гене дистрофина показал, что одни и те же мутации могут реализовываться различными фенотипами. Это указывает на то, что успех применения метода пропуска экзонов для лечения мышечной дистрофии Дюшенна имеет вероятностный характер даже в случае высокой эффективности индукции альтернативного сплайсинга и точная оценка вероятности успеха для конкретного варианта терапии затруднена из-за недостатка данных. Можно, однако, надеяться, что с развитием методов высокопроизводительного секвенирования ДНК и их удешевлением ситуация изменится.

Литература

1. van Deutekom JC, van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003 Oct; 4 (10): 774–83.
2. Rodino-Klapac LR, Chicoine LG, Kaspar BK, Mendell JR. Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. *Arch Neurol.* 2007 Sep; 64 (9): 1236–41.
3. Bushby K, Finke R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010 Jan; 9 (1): 77–93. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70271-6. Epub 2009 Nov 27.
4. Boland BJ, Silbert PL, Groover RV, Wollan PC, Silverstein MD. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol.* 1996 Jan; 14 (1): 7–12.
5. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron.* 1989 Jan; 2 (1): 1019–29.
6. Homo sapiens dystrophin (DMD), RefSeqGene (LRG_199) on chromosome X [Интернет]. The National Center for Biotechnology Information [дата обращения: 8 июля 2015 г.]. Доступно по ссылке: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/256355061>.
7. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell.* 1988 Apr 22; 53 (2): 219–28.
8. Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet.* 1995 Feb; 9 (2): 184–90.
9. Peter AK, Cheng H, Ross RS, Knowlton KU, Chen J. The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol.* 2011 May; 31 (2): 83–8.
10. Jaka O, Casas-Fraile L, López de Munain A, Sáenz A. Costamere proteins and their involvement in myopathic processes. *Expert Rev Mol Med.* 2015 Jun 19; 17: e12.
11. Iannaccone ST, Castro D. Congenital muscular dystrophies

- and congenital myopathies. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2013 Dec; 19 (6 Muscle Disease): 1509–34.
12. Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Oct; 7 (10): 762–73. Epub 2006 Sep 13.
 13. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet*. 2016 Mar; 53 (3): 145–51. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103387. Epub 2016 Jan 11.
 14. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*. 1995 Mar 10; 80 (5): 675–9.
 15. Blat Y, Blat S. Drug Discovery of Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Biomol Screen*. 2015 Dec; 20 (10): 1189–203. Epub 2015 May 14.
 16. Kole R, Leppert BJ. Targeting mRNA splicing as a potential treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Discov Med*. 2012 Jul; 14 (74): 59–69.
 17. van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med*. 2007 Dec 27; 357 (26): 2677–86.
 18. Aartsma-Rus A, van Ommen GJ. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA*. 2007 Oct; 13 (10): 1609–24. Epub 2007 Aug 7.
 19. Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szegedy CA, Maiti B, Findlay A, et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat Med*. 2014 Sep; 20 (9): 992–1000. Epub 2014 Aug 10.
 20. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. 1989 Jun 30; 244 (4912): 1578–80.
 21. White SJ, den Dunnen JT. Copy number variation in the genome; the human DMD gene as an example. *Cytogenet Genome Res*. 2006; 115 (3–4): 240–6.
 22. Leiden Open Variation Database, Leiden Muscular Dystrophy pages [Интернет]. Leiden University Medical Center. c2004–2014 [дата обращения: 6–15 июня 2016 г.]. Доступно по ссылке: <http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php>.
 23. Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet*. 1992 Nov; 1 (8): 599–603.
 24. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve*. 2006 Aug; 34 (2): 135–44.
 25. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Marie SK, Zatz M. Half the dystrophin gene is apparently enough for a mild clinical course: confirmation of its potential use for gene therapy *Hum Mol Genet*. 1994 Jun; 3 (6): 919–22.
 26. Takeshima Y, Nishio H, Narita N, Wada H, Ishikawa Y, Ishikawa Y, et al. Amino-terminal deletion of 53 % of dystrophin results in an intermediate Duchenne-Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology*. 1994 Sep; 44 (9): 1648–51.
 27. Suminaga R, Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Matsuo M. C-terminal truncated dystrophin identified in skeletal muscle of an asymptomatic boy with a novel nonsense mutation of the dystrophin gene. *Pediatr Res*. 2004 Nov; 56 (5): 739–43. Epub 2004 Sep 15.
 28. Prior TW, Bartolo C, Pearl KP, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, et al. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet*. 1995 Jul; 57: 22–33.
 29. Nicolas A, Lucchetti-Miganeh C, Yaou RB, Kaplan JC, Chelly J, Leturcq F, et al. Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the DMD gene, using the tools included in the eDystrophin online database. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 Jul 9; 7: 45.

References

1. van Deutekom JC, van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2003 Oct; 4 (10): 774–83.
2. Rodino-Klapac LR, Chicoine LG, Kaspar BK, Mendell JR. Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. *Arch Neurol*. 2007 Sep; 64 (9): 1236–41.
3. Bushby K, Finke R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 2010 Jan; 9 (1): 77–93. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70271-6. Epub 2009 Nov 27.
4. Boland BJ, Silbert PL, Groover RV, Wollan PC, Silverstein MD. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol*. 1996 Jan; 14 (1): 7–12.
5. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron*. 1989 Jan; 2 (1): 1019–29.
6. Homo sapiens dystrophin (DMD), RefSeqGene (LRG_199) on chromosome X [Internet]. The National Center for Biotechnology Information. [cited 2015 Jul 8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/256355061>.
7. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988 Apr 22; 53 (2): 219–28.
8. Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet*. 1995 Feb; 9 (2): 184–90.
9. Peter AK, Cheng H, Ross RS, Knowlton KU, Chen J. The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol*. 2011 May; 31 (2): 83–8.
10. Jaka O, Casas-Fraile L, López de Munain A, Sáenz A. Costamere proteins and their involvement in myopathic processes. *Expert Rev Mol Med*. 2015 Jun 19; 17: e12.
11. Iannaccone ST, Castro D. Congenital muscular dystrophies and congenital myopathies. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2013 Dec; 19 (6 Muscle Disease): 1509–34.
12. Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Oct; 7 (10): 762–73. Epub 2006 Sep 13.
13. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet*. 2016 Mar; 53 (3): 145–51. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103387. Epub 2016 Jan 11.
14. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*. 1995 Mar 10; 80 (5): 675–9.
15. Blat Y, Blat S. Drug Discovery of Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Biomol Screen*. 2015 Dec; 20 (10): 1189–203. Epub 2015 May 14.
16. Kole R, Leppert BJ. Targeting mRNA splicing as a potential treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Discov Med*. 2012 Jul; 14 (74): 59–69.
17. van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med*. 2007 Dec 27; 357 (26): 2677–86.
18. Aartsma-Rus A, van Ommen GJ. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA*. 2007 Oct; 13 (10): 1609–24. Epub 2007 Aug 7.
19. Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szegedy CA, Maiti B, Findlay A, et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat Med*. 2014 Sep; 20 (9): 992–1000. Epub 2014 Aug 10.
20. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. 1989 Jun 30; 244 (4912): 1578–80.

- 244 (4912): 1578–80.
21. White SJ, den Dunnen JT. Copy number variation in the genome; the human DMD gene as an example. *Cytogenet Genome Res.* 2006; 115 (3–4): 240–6.
22. Leiden Open Variation Database, Leiden Muscular Dystrophy pages [Internet]. Leiden University Medical Center. c2004–2014 [cited 2016 Jun 6–15]. Available from: <http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php>.
23. Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet.* 1992 Nov; 1 (8): 599–603.
24. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve.* 2006 Aug; 34 (2): 135–44.
25. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Marie SK, Zatz M. Half the dystrophin gene is apparently enough for a mild clinical course: confirmation of its potential use for gene therapy *Hum Mol Genet.* 1994 Jun; 3 (6): 919–22.
26. Takeshima Y, Nishio H, Narita N, Wada H, Ishikawa Y, Ishikawa Y, et al. Amino-terminal deletion of 53 % of dystrophin results in an intermediate Duchenne-Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology.* 1994 Sep; 44 (9): 1648–51.
27. Suminaga R, Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Matsuo M. C-terminal truncated dystrophin identified in skeletal muscle of an asymptomatic boy with a novel nonsense mutation of the dystrophin gene. *Pediatr Res.* 2004 Nov; 56 (5): 739–43. Epub 2004 Sep 15.
28. Prior TW, Bartolo C, Pearl KP, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, et al. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet.* 1995 Jul; 57: 22–33.
29. Nicolas A, Lucchetti-Miganeh C, Yaou RB, Kaplan JC, Chelly J, Leturcq F, et al. Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the DMD gene, using the tools included in the eDystrophin online database. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Jul 9; 7: 45.

МИЦЕЛЛЯРНЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ α -ФЕТОПРОТЕИНОМ АМФИФИЛЬНЫХ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ГАДОЛИНИЙ И КУРКУМИН

Н. В. Позднякова¹✉, Е. Ю. Григорьева¹, А. Б. Шевелев²

¹ Лаборатория радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии, Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина, Москва

² Лаборатория процессов фотосенсибилизации, Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Москва

Предложен метод получения мицеллярных композиций куркумина и ионов гадолиния на основе трехблочных амфифильных сополимеров полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля Pluronic F-127 и Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich, США), поверхность которых функционализирована рекомбинантным производным α фетопротейна человека. Методом динамического светорассеяния определили размер наночастиц, и он составил в среднем 50–100 нм. Композиции отличались устойчивостью: в течение 10 суток хранения при +4 °С характеристики мицелл изменялись в пределах стандартной ошибки измерения для выбранных аналитических методов. Предварительные эксперименты *in vivo* на мышах показали отсутствие явно выраженной токсичности композиций при максимально возможной концентрации гадолиния, что делает возможным их дальнейшее использование для визуализации опухолевых тканей *in vivo*.

Ключевые слова: визуализация, контрастные средства, гадолиний, куркумин, мицеллярная композиция, Pluronic F-127, Pluronic P-123

Финансирование: исследование поддержано Министерством образования и науки Российской Федерации (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0133 от 27.10.2015, уникальный идентификатор RFMEFI60715X0133).

✉ Для корреспонденции: Позднякова Наталья Владимировна
115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24; natpo2002@mail.ru

Статья получена: 23.06.2016 Статья принята в печать: 27.06.2016

GADOLINIUM- AND CURCUMIN-LOADED MICELLES BASED ON α -FETOPROTEIN FUNCTIONALIZED AMPHIPHILIC BLOCK COPOLYMERS

Pozdniakova NV¹✉, Grigorieva EYu¹, Shevelev AB²

¹ Laboratory of Radionuclide and Beam Technologies in Experimental Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

² Laboratory of Light Sensitization, N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow, Russia

This article describes a method of obtaining curcumin- and gadolinium-loaded micelles based on triblock amphiphilic polyethylene glycol and polypropylene glycol copolymers Pluronic F-127 and Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich, USA) superficially functionalized with recombinant human α -fetoprotein. The size of nanoparticles was measured using dynamic light scattering and amounted to an average of 50 to 100 nm. The micelles were stable: stored at +4 °C for 10 days, they exhibited no changes in their properties that would not fall within the standard error of measurement for the methods used for the analysis. Preliminary *in vivo* experiments conducted on mice showed no conspicuous toxicity of micelles with the maximum possible concentration of gadolinium, which enables their use in tumor tissue imaging *in vivo*.

Keywords: imaging, contrast agents, gadolinium, curcumin, micelles, Pluronic F-127, Pluronic P-123

Funding: the study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Grant Agreement no.14.607.21.0133 dated October 27, 2015, Project ID RFMEFI60715X0133).

✉ Correspondence should be addressed: Natalia Pozdniakova
Kashirskoe shosse, d. 24, Moscow, Russia, 115478; natpo2002@mail.ru

Received: 23.06.2016 Accepted: 27.06.2016

Ион гадолиния (Gd^{3+}) обладает уникальными парамагнитными свойствами, важными для медицинской диагностики (магнитно-резонансная томография, МРТ) и лечения (поражение опухолевых клеток вторичным тепловым излучением) [1]. Время релаксации электронно-спиновой решетки контрастирующих агентов на основе Gd^{3+} T1 составляет около 0,1 нсек, что на порядок меньше времени релаксации протонов в воде [2]. Поскольку сам по себе Gd^{3+} токсичен даже в низких концентрациях, достаточных для контрастирования, его используют в хелатированной форме с комплексообразователями, которые обладают высокими константами связывания, например диэтилен-триаминопентауксусной кислотой [3]. Наночастицы, содержащие хелатированную форму Gd^{3+} , рутинно применяют для прижизненного контрастирования при выполнении МРТ различных тканей: структур мозга [4], сосудистых плексусов [5], миокарда и коронарных сосудов [6].

В работе Kang и соавт. [7] описан метод получения наночастиц оксида гадолиния $Gd@SiO_2$ -DO3A и $Gd@SiO_2$ -DO2A-BTA размером 50–60 нм. Наночастицы изготавливали из тетраэтилортосиликата (TEOS) и (3-аминопропил)триэтоксисилана (APTES) с последующей функционализацией аминопропилсилановых групп 1,4,7,10-тетраазациклодекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислотой (DOTA) или 1,4,7,10-тетраазациклодекан-1,4,7-трисукусной кислотой, конъюгированной с бензотиазолом (DO3A-BTA). Полученные наночастицы отличались высокой растворимостью и стабильностью коллоидного раствора. Их релаксивность $r1$ оказалась намного выше, чем у низкомолекулярных контрастных веществ, а соотношение $r2/r1$ [8] приближалось к 1, что позволяет использовать их в МРТ [9]. Исследование биораспределения наночастиц показало, что $Gd@SiO_2$ -DO2A-BTA выводятся из организма преимущественно с желчью и мочой. Они также накапливались в опухолевых клетках и оказались пригодны для уничтожения *in vivo* таких перевиваемых клеточных линий, как SK-HEP-1, MDA-MB-231, HeLa и Hep 3B. Хотя имеются сообщения о кумулятивной токсичности наноструктурированных контрастных веществ на основе гадолиния [10, 11], в частности, нефротоксичности [12], их применение в МРТ-диагностике различных заболеваний, а также перспектива использования в терапии опухолей представляют научный интерес, что подтверждается публикациями на эту тему [13].

Целью исследования являлась разработка технологии получения низкотоксичной композиции, содержащей Gd^{3+} , для визуализации опухолевых тканей *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для обеспечения низкой токсичности композиции, предотвращения ее неспецифического связывания с нормальными тканями и обеспечения тропности к опухолевым клеткам были разработаны три решения.

Во-первых, в качестве комплексообразователя для ионов гадолиния использовали нетоксичное природное соединение — куркумин (рис. 1), содержащееся в большом количестве в корневищах индийского шафрана *Curcuma longa* и обладающее важными в контексте исследования характеристиками [14]: способностью вступать в устойчивые координационные связи с переходными металлами [15]; отсутствием токсичности в используемых концентрациях; гидрофобностью, что важно для включения комплексных соединений во внутреннюю область мицеллы

и обеспечения устойчивости мицелл в водных растворах.

Во-вторых, получили мицеллярную форму композиции. В настоящее время технология изготовления мицеллярных форм препаратов используется в биотехнологии [16] и имеет перспективу применения в фармацевтике [17]. Мицеллярные формы обладают рядом преимуществ: в водных растворах они самоорганизуются в структуры с внутренней гидрофобной частью и наружной гидрофильной сферой, что позволяет включать внутрь плохо растворимые вещества и таким образом защищать последние от инактивации в биологических средах; имеют небольшой размер (менее 100 нм); циркулируют в крови долгое время; просты в изготовлении [18]. К преимуществам мицелл на основе блок-сополимеров (плуроников) можно отнести низкую цитотоксичность и слабую иммуногенность, а также простоту модификации поверхности функциональными группами для придания различных свойств. В нашей работе в качестве мицеллообразующих веществ были использованы амфифильные трехблочные сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля Pluronic F-127 и Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich, США) (рис. 2).

В-третьих, отработали технологию придания функциональности (таргетности) мицеллам путем иммобилизации на их поверхности рекомбинантного векторного белка — фрагмента α фетопротеина человека, обладающего сродством к опухолям многих типов [19].

В работе использовали следующие реагенты (все — производства Sigma-Aldrich, США): гадолиния нитрат (III) шестиводный, трехблочные сополимеры Pluronic F-127 и Pluronic P-123, триэтиламин, куркумин, 1,1'-карбонилдимидазол, N-гидроксисукцинимид, 2,4,6-тринитробензолсульфоновую кислоту, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид, метанол, диметилформамид, этаноламин, кобальта тиоцианат, бария гидроксид. Процедура получения векторного белка на основе α -фетопротеина человека описана в работе [19].

Получение комплексов куркумина с ионами гадолиния

Комплексы формировали в органическом растворителе тетрагидрофуране при смешивании нитрата гадолиния, куркумина и триэтиламина в молярном соотношении ~ 3 : 1 : 1 с нагреванием при 50 °C в течение 30 мин с последующим удалением триэтиламина и растворителя в роторном испарителе. Более подробный протокол: 100 мкл 0,5 М

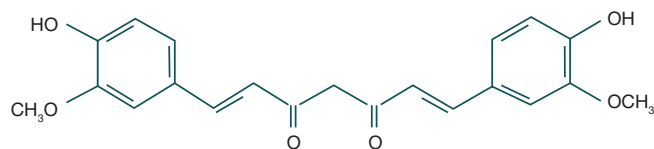


Рис. 1. Структурная формула куркумина

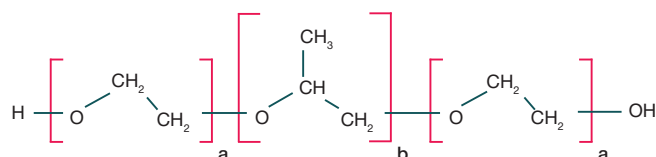


Рис. 2. Структура амфифильных трехблочных сополимеров Pluronic F-127 и Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich, США), где a — число гидрофильных мономеров, b — число гидрофобных мономеров. Формула a-b-a для Pluronic F-127 — 98–67–98, для Pluronic P-123 — 20–70–20

раствора куркумина в тетрагидрофуране смешивали с 300 мкл 0,5 М раствора нитрата гадолиния в тетрагидрофуране; затем при интенсивном перемешивании добавляли по каплям 100 мкл 0,5 М раствора триэтиламина в метаноле в течение 1–2 мин; смесь прогревали при перемешивании при 50 °С в течение 30 мин; растворители и триэтиламин удаляли из раствора с помощью роторного испарителя при 50 °С; осадок промывали метанолом и высушивали на воздухе.

Качественный анализ образования комплекса Gd^{3+} проводили на спектрофотометре Cary 50 Scan UV-Vis (Agilent Technologies, США) в диапазоне 300–650 нм в одноразовой кювете с длиной пути 1 см (Sigma-Aldrich, кат. № Z330418). Аликвоту комплекса массой от одного до нескольких мг отбирали шпателем в сухом виде, получали маточный раствор в диметилсульфоксиде (ДМСО), который затем разбавляли ДМСО до получения оптической плотности при 450 нм от 0,5 до 1,5. Концентрацию комплекса оценивали по высоте пика при 455 нм, который отсутствует у свободного куркумина. Для определения величины этого пика [20] из полученного спектра реакционной смеси вычитали спектр раствора свободного куркумина в ДМСО, взятого в той же концентрации, что указана выше.

Получение модифицированного сополимера Pluronic F-127 с концевыми NHS-группами для иммобилизации векторного белка на поверхности мицелл

Модификацию одного из сополимеров (Pluronic F 127) проводили в диметилформамиде (ДМФА) в два этапа. Сначала активировали концевые гидроксильные группы карбонилдиимидазолом (CDIz), затем проводили реакцию с N-гидроксисукцинимидом (NHS) (рис. 3). Более подробный протокол: 204 мг Pluronic F 127, 19 мг NHS и 26 мг CDIz смешивали в сухом виде и доводили объем реакционной смеси до 500 мкл с помощью ДМФА, перемешивали в течение 1 ч при 37 °С до прекращения выделения пузырьков газообразного CO_2 ; избыток CDIz удаляли, добавляя в реакционную смесь 50 мкл воды; после гидролиза избытка CDIz модифицированный сополимер экстрагировали несколько раз диэтиловым эфиром; осадок высушивали на воздухе.

Количество концевых NHS групп в модифицированном Pluronic F 127 определяли реакцией с избытком этаноламина в 10 мМ боратном буфере (pH 8,5) с последующим титрованием не прореагировавших аминогрупп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), как описано в работе [21].

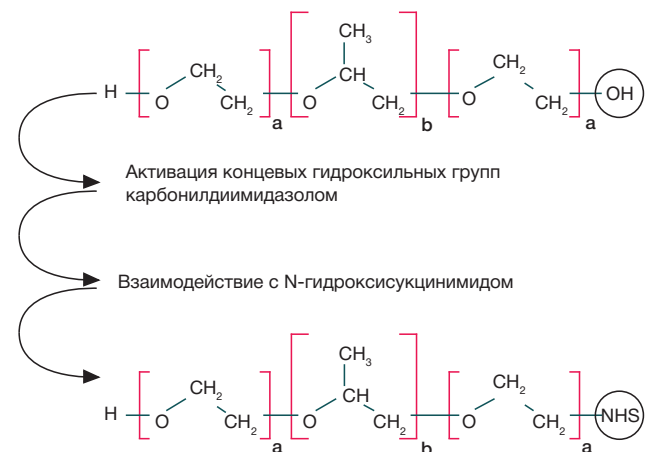


Рис. 3. Принципиальная химическая схема получения модифицированного Pluronic F-127

Получение мицеллярных композиций

Мицеллярные системы различного состава на основе модифицированного сополимера получали по следующей схеме. Навески комплекса куркумин-гадолиний и плюроники растворяли в тетрагидрофуране и смешивали. Количество и соотношение компонентов в разных композициях варьировали (таблица). Затем раствор помещали в колбу роторного испарителя и удаляли органический растворитель при 50 °С при вращении роторной колбы. Добавляли в колбу дистиллированную воду и интенсивно перемешивали в течение 15 мин, после чего центрифугировали, отбирали супернатант и диализовали против фосфатно-солевого буфера (pH 7,5) при +4 °С в течение 24 ч.

Эффективность включения основного вещества в мицеллы (%) рассчитывали по формуле

$$\Theta_{\text{вкл}} = \frac{M_{\text{вкл}} \times 100}{M_{\text{исх}}},$$

где $M_{\text{вкл}}$ — масса включенного комплекса куркумин-гадолиний, $M_{\text{исх}}$ — исходная масса комплекса куркумин-гадолиний.

Степень нагрузки (масс.%) рассчитывали по формуле

$$C_{\text{нгр}} = \frac{M_{\text{вкл}} \times 100}{M_{\text{вкл}} + M_{\text{пол}}},$$

где $M_{\text{пол}}$ — масса сополимера.

Химическая модификация поверхности мицелл

Конъюгацию мицелл с белком осуществляли, смешивая мицеллярный раствор на основе модифицированного полимера с раствором белка при молярном избытке сополимера (NHS групп) по отношению к белку. В качестве функционализирующего вещества использовали рекомбинантный модифицированный белок, соответствующий изолированному третьему домену α фетопротейна человека [19]. Подробный протокол: 1 мл мицеллярного раствора смешивали с 200 мкл раствора белка с концентрацией 3 мг/мл (0,1 мМ) в фосфатно-солевом буфере (pH 8,0) с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре; для блокирования избыточных реакционноспособных NHS групп по окончании конъюгации добавляли избыток этаноламина до конечной концентрации в растворе 10 мМ с дополнительной инкубацией в течение 2 ч при комнатной температуре и последующим диализом против фосфатно-солевого буфера (pH 7,2) при +4 °С в течение суток. Полученную композицию хранили в течение недели при +4 °С.

Качественно присутствие белка в полученной мицеллярной композиции оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующей окраской в течение 10 мин в 5 % водном растворе йодида бария [22].

Определение размера мицелл

Средний размер мицелл и их распределение по размеру измеряли методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Ltd., Великобритания) в термостатируемых пластиковых микрокуветах ZEN0040. Измерение проводили с помощью гелий-неонового лазера с длиной волны 633 нм мощностью 4 мВт при 25 °С. Образцы перед измерением разводили деионизованной водой в 10 раз. Измерения для каждого образца проводили трижды, вычисляя среднее квадратичное отклонение.

Определение содержания гадолиния в мицеллах

Измерения проводили на рентгенофлуоресцентном анализаторе «Х-арт М» («Комита», Россия). Количественное определение производили относительным методом путем сравнения сигнала от исследуемых проб с сигналами от растворов сравнения с известными концентрациями гадолиния.

Определение содержания куркумина в мицеллах

Содержание куркумина оценивали по поглощению при длине волны 430 нм по сравнению с калибровочными растворами известной концентрации на спектрофотометре Cary 50 Scan UV-Vis в одноразовой кювете (Sigma-Aldrich, кат. № Z330418).

Содержание сухого вещества в полимерной форме

Определяли с помощью метода, описанного в работе [23] с модификациями. Приготовление реагента: смешивали 0,2 мл 2,6 М водного раствора тиоцианата кобальта (CoSCN) и 0,8 мл 0,8 М водного раствора гидроксида бария. Измерение: смешивали 10 мкл аликвоты раствора, содержащего плуроник, и 10 мкл реагента, интенсивно перемешивали, центрифугировали, тщательно удаляли супернатант, подсушивали на воздухе, добавляли к осадку 100 мкл ДМСО и 5 мкл 5 М HCl. Измеряли поглощение при 630 нм на приборе Titertek Multiskan Plus (LabX, Канада) в 96-луночных планшетах. Параллельно проводили измерения калибровочных растворов с известной концентрацией вещества и вычисляли концентрацию в анализируемом образце с помощью калибровочной кривой.

Определение общего белка

Содержание белка оценивали с помощью модифицированного метода Лоури с применением бицинхоновой кислоты (Sigma-Aldrich). В качестве калибровочного раствора взяли стандартный раствор бычьего сывороточного альбумина [24].

Оценка токсичности мицеллярной композиции комплекса куркумин-гадолиний

Для подтверждения возможности дальнейших исследований *in vivo* был проведен эксперимент по исследованию переносимости мицеллярной композиции животными. Использовали 10 самок мышей линии C57/black средней массой 25 г. Характеристики композиции при введении животным: Gd^{3+} 10 mM, куркумин 10 mM, Pluronic F-127 5 mM, диаметр мицелл — 20 нм, буфер фосфатно-солевой (pH 7,0). Композицию вводили однократно в хвостовую вену в объеме 200 мкл. При выборе дозы стремились привести концентрацию плуроника в составе мицелл к той, которая оказалась оптимальной для доставки цитостатика «Доцетаксел» (Docetaxel) в клетки опухоли легких *in vivo* на мышиной модели [25]. Мышей наблюдали ежедневно в течение 2 мес., после чего их вывели из эксперимента и исследовали ткани гистологическими и патологоанатомическими методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реакцию комплексообразования контролировали по изменению спектра, в частности, появлению дополнительно го пика при 455 нм [20] (рис. 5).

Соотношение сополимер : NHS в модифицированном плуронике F-127 составило около 1 : 1. Всего получили около 100 мг в сухом виде модифицированного сополимера, содержащего одну NHS группу на молекулу.

Использованный метод получения мицеллярных композиций характеризовался эффективностью включения основного вещества в мицеллы в диапазоне 40–87 % и степенью нагрузки, равной 10–25 масс.%. В результате были получены мицеллярные растворы с различным содержанием основных компонентов (таблица).

Соотношение куркумина и ионов гадолиния в полученных композициях предполагает наличие вакантных валентностей у атома гадолиния, которые предположительно заняты молекулами воды, что важно для сохранения контрастных свойств при МРТ [26]. При оценке стабильности

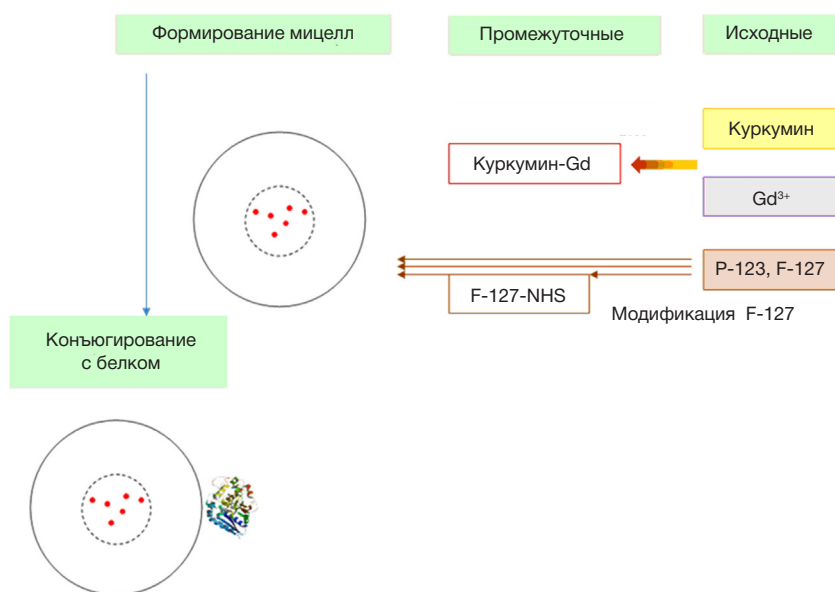


Рис. 4. Общая схема получения функционализированных мицеллярных композиций, содержащих гадолиний

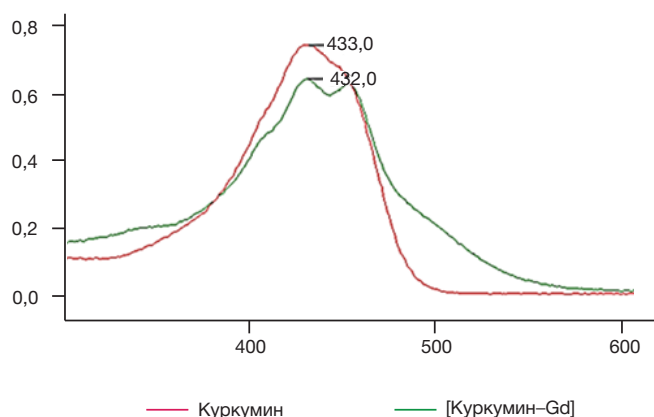


Рис. 5. Спектры куркумина и его комплекса с Gd^{3+}

композиций необходимо отметить, что измерения их размеров методом динамического светорассеяния, а также спектра поглощения в видимой области, характерного для комплекса куркумина с ионами Gd^{3+} , было воспроизведено через 10 дней хранения при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. При этом все показатели оказались неизменными: отличия не превышали стандартной ошибки измерения первоначального эксперимента.

Размер полученных мицелл приближался к 100 нм, не превышая этой величины, что позволяет циркулировать в кровотоке долгое время, избегая захвата портальной системой печени и ретикуло-эндотелиальной системой [27]. Это свойство важно для обеспечения адресности доставки мицелл в опухолевые ткани за счет иммобилизованного на поверхности функционального белкового адреса [28].

В ходе эксперимента на животных видимых проявлений токсичности мицеллярной композиции не наблюдали. В частности, не были выявлены симптомы отравления тяжелыми металлами [1] — коллаптоидные реакции, кро-

вотечения, сохранялся аппетит, активное движение, отсутствовали патологическая жажда и светобоязнь в течение всего времени наблюдения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работах [14, 29] доказана возможность использования куркумина в качестве комплексона, подавляющего токсичность ионов гадолиния *in vivo*. Patil и соавт. [29] использовали данные комплексы для контрастирования амилоидных бляшек при диагностике болезни Альцгеймера. При этом исследователи использовали естественное средство куркумина к β амилоиду. В нашей работе впервые показана возможность инкапсуляции гидрофобных комплексов куркумина во внутреннем пространстве мицелл, образованных плурониками (блок-сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля). Благодаря выявленной устойчивости таких мицелл в водных средах собственные фармакокинетические характеристики куркумина перестают играть ключевую роль в распределении ионов Gd^{3+} в организме, тогда как высокая стабильность хелатированного комплекса сохраняется.

В работе [7] была поставлена задача, практически идентичная нашей, однако она была решена альтернативным способом: за счет включения ионов Gd^{3+} в наночастицы кремния. Это показывает практическую значимость самой задачи. При этом предлагаемое нами решение имеет важное технологическое преимущество перед описанным в работе [7]: оно может быть реализовано в биохимической лаборатории с применением коммерческих реагентов и общедоступного лабораторного оборудования с выходом, близким к 100 %, без привлечения профессиональных химиков-синтетиков. Предложенная технология имеет преимущество при масштабировании: она позволяет получать наноразмерные частицы, содержащие ионы Gd^{3+} , как

Состав полученных мицеллярных композиций

№	Описание	Концентрация компонентов	Средний диаметр мицеллы, нм
1	Gd^{3+} – куркумин – P-123	Gd^{3+} – 12 мМ Куркумин – 12 мМ P-123 – 3 мМ	$57,0 \pm 1,2$
2	Gd^{3+} – куркумин – F-127	Gd^{3+} – 10 мМ Куркумин – 10 мМ F-127 – 5 мМ	$20,0 \pm 0,9$
3	Gd^{3+} – куркумин – P-123 – F-127	Gd^{3+} – 9 мМ Куркумин – 21 мМ P-123 – 2,7 мМ F-127 – 2,7 мМ	$83,0 \pm 1,4$
4	Gd^{3+} – куркумин – F-127 – белок	Gd^{3+} – 57 мМ Куркумин – 30 мМ F-127 – 4 мМ Белок – 0,7 мг/мл	$32,0 \pm 2,2$
5	Gd^{3+} – куркумин – P-123 – F-127 – белок	Gd^{3+} – 18 мМ Куркумин – 8,4 мМ P-123 – 2,5 мМ F-127 – 2,5 мМ Белок – 1,1 мг/мл	$69,0 \pm 1,3$

Примечание: P-123 — Pluronic P-123, F-127 — Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, США).

в минимально необходимых для эксперимента объемах, так и в промышленных объемах. При этом, несмотря на простоту технологии, абсолютные размеры частиц, разброс размеров и содержание в них основного вещества практически не отличаются от показателей, рекомендованных в работе [8]. Этот результат достигнут, в первую очередь, благодаря оптимальным свойствам природного комплексона куркумина в качестве хелатора ионов Gd^{3+} .

Важным преимуществом мицелл перед твердыми наночастицами оксида кремния является также способность долгое время циркулировать в кровотоке, не подвергаясь элиминации производными моноцитов печени [9]. В то же время, по данным литературы мицеллы хорошо задерживаются сосудистой сетью опухолей, которая характеризуется большим числом разрывов и дефектов поверхности [30].

Дополнительное усиление адресности доставки мицелл, содержащих ионы Gd^{3+} , может быть достигнуто за счет использования различных адресных функциональных групп. Домен 3 α -фетопротейна, использованный в настоящей работе, имеет высокое сродство к рецепторам опухолей многих типов, так как, подобно альбумину, используется ими в качестве питательного субстрата [19]. Предложенная технология позволяет эффективно иммобилизовать на поверхности мицелл любые белковые, пептидные и другие адресные группировки.

ВЫВОДЫ

Показано, что комплексы куркумина с ионами гадолиния эффективно включаются и прочно удерживаются мицеллами, образованными блок-сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля (плюроникиами): в течение 10 суток хранения при +4 °C характеристики мицелл изменяются в пределах стандартной ошибки измерения выбранных аналитических методов. Мицеллы имеют стандартный размер 50–100 нм (в зависимости от соотношения компонентов), что обеспечивает их устойчивость в кровотоке долгое время.

Предложен метод модификации поверхности мицелл плюроники, содержащих комплексы куркумина и Gd^{3+} , адресными молекулами, в частности, доменом 3 α -фетопротейна человека.

Благодаря простоте, высокой эффективности и возможности работы с микроколичествами компонентов предложенный метод предназначен, в первую очередь, для решения исследовательских задач по изучению распределения макромолекул и их комплексов *in vivo*. Он может быть использован при скрининге функциональных адресных группировок, обеспечивающих доставку биомолекул и их комплексов в ткани и клетки различных типов, включая опухолевые.

Литература

- Goischke HK. MRI with gadolinium-based contrast agents: practical help to ensure patient safety. J Am Coll Radiol. 2016 Jun 18. pii: S1546-1440(16)30315-5.
- Dinger SC, Fridjhon P, Rubin DM. Thermal Excitation of Gadolinium-Based Contrast Agents Using Spin Resonance. PLoS One. 2016 Jun 24; 11 (6): e0158194.
- Saito K, Yoshimura N, Shiota N, Saguchi T, Sugimoto K., Tokuyue K. Distinguishing liver haemangiomas from metastatic tumours using gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced diffusion-weighted imaging at 1.5T MRI. J Med Imaging Radiat Oncol. 2016 Jun 21. doi: 10.1111/1754-9485.12487. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27324436.
- Hu HH, Pokorney A, Towbin RB, Miller JH. Increased signal intensities in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted images: evidence in children undergoing multiple gadolinium MRI exams. Pediatr Radiol. 2016 Jun 9. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27282825.
- Schnell S, Wu C, Ansari SA. Four-dimensional MRI flow examinations in cerebral and extracerebral vessels — ready for clinical routine? Curr Opin Neurol. 2016 Aug; 29 (4): 419–28. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27262148.
- Swoboda PP, McDiarmid AK, Erhayem B, Haaf P, Kidambi A, Fent GJ, et al. A novel and practical screening tool for the detection of silent myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2016 Jun 14. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27300573.
- Kang MK, Lee GH, Jung KH, Jung JC, Kim HK, Kim YH, et al. Gadolinium Nanoparticles Conjugated with Therapeutic Bifunctional Chelate as a Potential T1 Theranostic Magnetic Resonance Imaging Agent. J Biomed Nanotechnol. 2016 May; 12 (5): 894–908.
- De León-Rodríguez LM, Martins AF, Pinho MC, Rofsky NM, Sherry AD. Basic MR relaxation mechanisms and contrast agent design. J Magn Reson Imaging. 2015 Sep; 42 (3): 545–65.
- Yang CT, Chuang KH. $Gd(III)$ chelates for MRI contrast agents: from high relaxivity to “smart”, from blood pool to blood–brain barrier permeable. Medchemcomm. 2012; 3: 552–65.
- Maximova N, Gregori M, Zennaro F, Sonzogni A, Simeone R, Zanon D. Hepatic gadolinium deposition and reversibility after contrast agent-enhanced MR imaging of pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. Radiology. 2016 Jun 8: 152846. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27276243.
- Vorobiov M, Basok A, Tovbin D, Shnaider A, Katchko L, Rogachev B. Iron-mobilizing properties of the gadolinium–DTPA complex: clinical and experimental observations. Nephrol Dial Transplant. 2003 May; 18 (5): 884–7.
- Ersay H, Rybicki FJ. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. J Magn Reson Imaging. 2007 Nov; 26 (5): 1190–7.
- Le Duc G, Roux S, Paruta-Tuarez A, Dufort S, Brauer E, Marais A, et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. Cancer Nanotechnol. 2014; 5 (1): 4.
- Heger M, van Golen RF, Broekgaarden M, Michel MC. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. Pharmacol Rev. 2013 Dec 24; 66 (1): 222–307.
- Pröhl M, Schubert US, Weigand W, Gottschaldt M. Metal complexes of curcumin and curcumin derivatives for molecular imaging and anticancer therapy. Coord Chem Rev. 2016 Jan 15; 307 (Pt 1): 32–41.
- Carstens MG, Rijcken CJF, van Nostrum CF, Hennink WE. Pharmaceutical micelles: combining longevity, stability and stimuli sensitivity. In: Fundamental Biomedical Technologies. Vol. 4: Torchilin V, editor. Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. New York: Springer; 2008. p. 263–308.
- Oerlemans C, Bult W, Bos M, Storm G, Nijssen JF, Hennink WE. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. Pharm Res. 2010 Dec; 27 (12): 2569–89.
- Alexandridis P, Hatton TA. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 1995 Mar 10; 96 (1–2): 1–46.

19. Pozdniakova NV, Gorokhovets NV, Gukasova NV, Bereznikova AV, Severin ES. New protein vector ApE1 for targeted delivery of anticancer drugs. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 469756.
 20. Ferrari E, Asti M, Benassi R, Pignedoli F, Saladini M. Metal binding ability of curcumin derivatives: a theoretical vs. experimental approach. *Dalton Trans*. 2013 Apr 21; 42 (15): 5304–13.
 21. Fields R. The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods Enzymol*. 1972; 25: 464–8.
 22. Kurfürst MM. Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1992 Feb 1; 200 (2): 244–8.
 23. Crabb NT, Persinger HE. The determination of polyoxyethylene nonionic surfactants in water at the parts per million level. *J Am Oil Chem Soc*. 1964; 41 (11): 752–5.
 24. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct; 150 (1): 76–85.
 25. Chen L, Sha X, Jiang X, Chen Y, Ren Q, Fang X. Pluronic P105/F127 mixed micelles for the delivery of docetaxel against Taxol-resistant non-small cell lung cancer: optimization and in vitro, in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 73–84.
 26. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev*. 1999 Sep 8; 99 (9): 2293–352.
 27. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14; 95 (8): 4607–12.
 28. Maruyama K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Mar 18; 63 (3): 161–9.
 29. Patil R, Gangalum PR, Wagner S, Portilla-Arias J, Ding H, Rekechenetskiy A, et al. Curcumin targeted, polymalic acid-based MRI contrast agent for the detection of A β plaques in Alzheimer's disease. *Macromol Biosci*. 2015 Sep; 15 (9): 1212–7.
 30. Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Front Pharmacol*. 2014 Apr 25; 5: 77.
- References**
1. Goischke HK. MRI with gadolinium-based contrast agents: practical help to ensure patient safety. *J Am Coll Radiol*. 2016 Jun 18. pii: S1546-1440(16)30315-5.
 2. Dinger SC, Fridjhon P, Rubin DM. Thermal Excitation of Gadolinium-Based Contrast Agents Using Spin Resonance. *PLoS One*. 2016 Jun 24; 11 (6): e0158194.
 3. Saito K, Yoshimura N, Shiota N, Suguchi T, Sugimoto K., Tokuyue K. Distinguishing liver haemangiomas from metastatic tumours using gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced diffusion-weighted imaging at 1.5T MRI. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2016 Jun 21. doi: 10.1111/1754-9485.12487. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27324436.
 4. Hu HH, Pokorney A, Towbin RB, Miller JH. Increased signal intensities in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted images: evidence in children undergoing multiple gadolinium MRI exams. *Pediatr Radiol*. 2016 Jun 9. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27282825.
 5. Schnell S, Wu C, Ansari SA. Four-dimensional MRI flow examinations in cerebral and extracerebral vessels — ready for clinical routine? *Curr Opin Neurol*. 2016 Aug; 29 (4): 419–28. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27262148.
 6. Swoboda PP, McDiarmid AK, Erhayiem B, Haaf P, Kidambi A, Fent GJ, et al. A novel and practical screening tool for the detection of silent myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Jun 14. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27300573.
 7. Kang MK, Lee GH, Jung KH, Jung JC, Kim HK, Kim YH, et al. Gadolinium Nanoparticles Conjugated with Therapeutic Bifunctional Chelate as a Potential T1 Theranostic Magnetic Resonance Imaging Agent. *J Biomed Nanotechnol*. 2016 May; 12 (5): 894–908.
 8. De León-Rodríguez LM, Martins AF, Pinho MC, Rofsky NM, Sherry AD. Basic MR relaxation mechanisms and contrast agent design. *J Magn Reson Imaging*. 2015 Sep; 42 (3): 545–65.
 9. Yang CT, Chuang KH. Gd(III) chelates for MRI contrast agents: from high relaxivity to “smart”, from blood pool to blood–brain barrier permeable. *Medchemcomm*. 2012; 3: 552–65.
 10. Maximova N, Gregori M, Zennaro F, Sonzogni A, Simeone R, Zanon D. Hepatic gadolinium deposition and reversibility after contrast agent-enhanced MR imaging of pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Radiology*. 2016 Jun 8: 152846. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27276243.
 11. Vorobiov M, Basok A, Tovbin D, Shnaider A, Katchko L, Rogachev B. Iron-mobilizing properties of the gadolinium–DTPA complex: clinical and experimental observations. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 May; 18 (5): 884–7.
 12. Ersoy H, Rybicki FJ. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*. 2007 Nov; 26 (5): 1190–7.
 13. Le Duc G, Roux S, Paruta-Tuarez A, Dufort S, Brauer E, Marais A, et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol*. 2014; 5 (1): 4.
 14. Heger M, van Golen RF, Broekgaarden M, Michel MC. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol Rev*. 2013 Dec 24; 66 (1): 222–307.
 15. Pröhl M, Schubert US, Weigand W, Gottschaldt M. Metal complexes of curcumin and curcumin derivatives for molecular imaging and anticancer therapy. *Coord Chem Rev*. 2016 Jan 15; 307 (Pt 1): 32–41.
 16. Carstens MG, Rijcken CJF, van Nostrum CF, Hennink WE. Pharmaceutical micelles: combining longevity, stability and stimuli sensitivity. In: *Fundamental Biomedical Technologies*. Vol. 4: Torchilin V, editor. Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. New York: Springer; 2008. p. 263–308.
 17. Oerlemans C, Bult W, Bos M, Storm G, Nijssen JF, Hennink WE. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res*. 2010 Dec; 27 (12): 2569–89.
 18. Alexandridis P, Hatton TA. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1995 Mar 10; 96 (1–2): 1–46.
 19. Pozdniakova NV, Gorokhovets NV, Gukasova NV, Bereznikova AV, Severin ES. New protein vector ApE1 for targeted delivery of anticancer drugs. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 469756.
 20. Ferrari E, Asti M, Benassi R, Pignedoli F, Saladini M. Metal binding ability of curcumin derivatives: a theoretical vs. experimental approach. *Dalton Trans*. 2013 Apr 21; 42 (15): 5304–13.
 21. Fields R. The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods Enzymol*. 1972; 25: 464–8.
 22. Kurfürst MM. Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1992 Feb 1; 200 (2): 244–8.
 23. Crabb NT, Persinger HE. The determination of polyoxyethylene nonionic surfactants in water at the parts per million level. *J Am Oil Chem Soc*. 1964; 41 (11): 752–5.
 24. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct; 150 (1): 76–85.
 25. Chen L, Sha X, Jiang X, Chen Y, Ren Q, Fang X. Pluronic P105/F127 mixed micelles for the delivery of docetaxel against Taxol-

- resistant non-small cell lung cancer: optimization and in vitro, in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 73–84.
26. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev*. 1999 Sep 8; 99 (9): 2293–352.
 27. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14; 95 (8): 4607–12.
 28. Maruyama K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Mar 18; 63 (3): 161–9.
 29. Patil R, Gangalum PR, Wagner S, Portilla-Arias J, Ding H, Rekechenetskiy A, et al. Curcumin targeted, polymalic acid-based MRI contrast agent for the detection of A β plaques in Alzheimer's disease. *Macromol Biosci*. 2015 Sep; 15 (9): 1212–7.
 30. Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Front Pharmacol*. 2014 Apr 25; 5: 77.

ИММУНОМОДУЛЯТОР «ИМУНОФАН» ВЛИЯЕТ НА КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЗОН ТИМУСА КРЫС И ЗАМЕДЛЯЕТ ЕГО ВОЗРАСТНУЮ ИНВОЛЮЦИЮ

И. В. Бобрышева ✉

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, стоматологический факультет, Луганский государственный медицинский университет, Луганск, Украина

В клинической практике применяется иммуномодулятор «Имунофан» («Бионокс», Россия), воздействующий на иммунную и эндокринную системы и усиливающий клеточный и гуморальный иммунитет. Целью исследования являлось изучение содержания лимфобластов, малых, средних и больших лимфоцитов, макрофагов, митотически делящихся и деструктивно измененных клеток в субкапсулярной и внутренней зонах коркового вещества и мозговом веществе паренхимы тимуса беспородных белых крыс-самцов периода выраженных старческих изменений при иммуностимуляции «Имунофаном». Животным опытной группы ($n = 30$) вводили препарат внутримышечно из расчета 0,7 мг/кг в 1, 3, 5, 7 и 9-е сутки эксперимента, а животным контрольной группы ($n = 30$) — эквивалентный объем физиологического раствора в те же сроки. Декапитацию осуществляли на 1, 7, 15, 30 и 60-е сутки после последней инъекции. Срезы изучали с помощью микроскопа Olympus CX-41, фотоаппарата Olympus SP 500UZ (Olympus, Япония) и программного пакета Morpholog (Украина). Морфологические особенности органа в опытной и контрольной группах были схожими, но клеточный состав зон различался. В субкапсулярной зоне на 7, 15 и 30-е сутки было больше клеток лимфоидного ряда и макрофагов при одновременном снижении числа клеток с признаками деструкции ($p < 0,05$). Аналогичные статистически значимые закономерности были выявлены для внутренней зоны. В мозговом веществе содержание средних лимфоцитов было достоверно выше на 7, 15 и 30-е сутки наблюдения, а малых лимфоцитов — также и на 60-е сутки. Количество деструктивно измененных клеток значительно уменьшилось на 15 и 30-е сутки ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о заметной реактивности тимуса крыс периода выраженных старческих изменений на введение «Имунофана» и временном частичном замедлении его возрастной инволюции.

Ключевые слова: тимус, возрастная инволюция, иммуностимуляция, иммуномодулятор, имунофан, белые крысы

✉ Для корреспонденции: Бобрышева Инесса Венедиктовна
91016, Украина, г. Луганск, ул. 15 линия, д. 18, кв. 8; inessa_lug@mail.ru

Статья поступила: 31.05.2016 Статья принята к печати: 22.06.2016

IMMUNOMODULATOR IMUNOFAN AFFECTS CELL PROFILE OF MORPHOFUNCTIONAL ZONES OF RAT THYMUS AND DELAYS ITS AGE-RELATED INVOLUTION

Bobrysheva IV ✉

Department of Histology, Cytology and Embryology, Faculty of Stomatology, Lugansk State Medical University, Lugansk, Ukraine

The immunomodulatory agent Imunofan (Bionox, Russia) is widely used in clinical practice. It affects the immune and endocrine systems and enhances cell-mediated and humoral immunity. The aim of this study was to investigate the cell profile (lymphoblasts, small, medium and large lymphocytes, macrophages, mitotic cells and damaged cells) in the subcapsular and inner zones of the thymic cortex and thymic medulla of random-bred male albino rats with conspicuous age-related changes after stimulating their immune system with Imunofan. The animals in the experimental group ($n = 30$) were administered to intramuscular injections of the drug (0.7 mg/kg) on the 1st, 3rd, 5th, 7th and 9th days of the experiment; the controls ($n = 30$) were administered to the equivalent amount of normal saline on the same days. Rats were decapitated on the 1st, 7th, 15th, 30th and 60th days after the final injection. Thymic sections were studied using Olympus CX-41 microscope, Olympus SP 500UZ camera (Olympus, Japan) and Morpholog software (Ukraine). Thymic morphology was similar in the experimental and control groups; however, cell profiles were different. On the 7th, 15th and 30th days, lymphoid cells and macrophages prevailed over damaged cells, the number of which decreased ($p < 0.05$). Similar statistically significant trends were found in the inner zone of the thymic cortex. The number of medium lymphocytes was statistically higher on the 7th, 15th and 30th days of the observation, while the number of small lymphocytes was also higher on the 60th day of the observation. The number of damaged cells was significantly lower on the 15th and 30th days ($p < 0.05$). The obtained results indicate conspicuous thymic response in rats with conspicuous age-related changes to Imunofan administration, and partial temporary delay of age-related thymic involution.

Keywords: thymus, age-related involution, immune stimulation, immunomodulator, Imunofan, albino rats

✉ Correspondence should be addressed: Inessa Bobrysheva
ul. 15-ya Liniya, d.18, kv. 8, Lugansk, Ukraine, 91016; inessa_lug@mail.ru

Received: 31.05.2016 Accepted: 22.06.2016

Тимус как центральный орган иммунной системы определяет выраженность защитных реакций организма и обеспечивает иммунный гомеостаз. Морфологические перестройки в тимусе, возникающие в ответ на действие различных факторов, в том числе введение препаратов с иммуностимулирующими свойствами, сопровождаются изменением цитоархитектоники и микроокружения клеток [1–7].

В клинической практике широко применяется иммуномодулятор «Имунофан», воздействующий на иммунную и эндокринную системы и усиливающий клеточный и гуморальный иммунитет [8]. Это синтетический иммунорегуляторный гексапептид (аргинил- α -аспартил-лизил-валлил-тирозил-аргинин), созданный на основе одного из фрагментов тимопоэтина, включающего аминокислотные остатки его активного центра. Фармакологическое действие «Имунофана» заключается в коррекции состояния иммунной системы и установлении баланса окислительно-антиокислительных реакций в организме. Действие препарата начинается через 2–3 ч после введения и продолжается до 4 мес. В быстрой фазе действия (первые 2–3 суток) наблюдается прежде всего детоксикационный эффект: «Имунофан» нормализует перекисное окисление липидов, ингибирует распад фосфолипидов клеточной мембраны и синтез арахидоновой кислоты. В средней фазе (длится 7–10 суток) усиливаются реакции фагоцитоза и гибели внутриклеточных бактерий и вирусов, а в медленной (длится до 4 мес.) — восстанавливаются нарушенные показатели клеточного и гуморального иммунитета.

Имеется большое число исследований, посвященных изучению влияния «Имунофана» на различные системы организма животных и человека [1, 3, 9–12], однако особенностям цитоархитектоники различных зон тимуса при иммуностимуляции препаратом, в том числе в разном возрасте, уделено недостаточно внимания. Целью исследования являлось изучение клеточного состава структурно-функциональных зон паренхимы тимуса крыс периода выраженных старческих изменений при иммуностимуляции «Имунофаном».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование провели на 60 белых беспородных крысах-самцах в возрасте 20 мес. и массой 300–330 г. Животных содержали в виварии (температура — 20–25 °С, влажность — не более 50 %, искусственное освещение — 12 ч, с 8:00 до 20:00) в стандартных пластиковых клетках по шесть особей в каждой со свободным доступом к воде и пище [13]. Ежедневное наблюдение за поведением и общим состоянием крыс показало, что все они были здоровы и активны.

Животных разделили на две группы по 30 особей. Крысам опытной группы вводили внутримышечно «Имунофан» («Бионокс», Россия, регистрационное свидетельство UA/0318/01/01) из расчета 0,7 мг/кг раз в сутки по схеме: 1, 3, 5, 7 и 9-е сутки (способ введения и дозу выбрали на основе рекомендаций для человека). Крысам контрольной группы вводили внутримышечно 0,9 % раствор хлорида натрия в эквивалентном объеме и в те же сроки. В обеих группах животных выводили из эксперимента по шесть особей через 1, 7, 15, 30 и 60 суток с момента последнего введения препарата (раствора NaCl) путем декапитации под эфирным наркозом.

Объектом исследования служил тимус. Забор, фиксацию материала и изготовление парафиновых блоков

выполняли согласно общепринятым методикам работы с лимфоидными органами [14]. Для изучения структурных компонентов тимуса парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а для идентификации клеток — азуром II и эозином. Гистологическое строение исследовали с помощью аппаратно-программного комплекса, включавшего микроскоп Olympus CX-41, цифровой фотоаппарат Olympus SP 500UZ (Olympus, Япония) и программный пакет Morpholog (Украина) [15]. Микрофотографии получали в нескольких режимах увеличения, используя объективы PlanC N x10/0,25 ∞ /-FN22, PlanC N x40/0,65 ∞ /0,17/FN22, PlanC N x60/0,80 ∞ /0,17/FN22 с приближением zoom 132 и zoom 142. Изучали по шесть гистологических срезов тимуса каждого животного в шести полях зрения, что считается достаточным для получения репрезентативных результатов [16].

Определяли относительное содержание различных клеточных элементов (лимфобластов, малых, средних и больших лимфоцитов, макрофагов, митотически делящихся и деструктивно измененных клеток) на 100 клеток в структурно-функциональных зонах паренхимы тимуса: субкапсулярной зоне, внутренней зоне коркового вещества и мозговом веществе. Малые, средние и большие лимфоциты дифференцировали, основываясь на морфометрических показателях площади ядра клеток. Согласно Кривенцову [17], лимфоциты, имеющие площадь ядра от 6 до 14 мкм², расцениваются как малые, от 14 до 22 мкм² — как средние и от 22 до 30 мкм² — как большие.

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$). Распределение данных было нормальным. Тип распределения определяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Рассчитывали среднее арифметическое и ошибку среднего арифметического ($M \pm m$).

Эксперимент был выполнен с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), и одобрен Комиссией по вопросам биоэтики Луганского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 19.01.2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Возрастная инволюция тимуса была подтверждена сравнительным гистологическим исследованием тимуса крыс контрольной группы и крыс в период полового созревания (данные были получены нами ранее [18]). Размеры тимических долек визуальнее меньше, чем у более молодых животных (рис. 1). Они разделены перегородками, образованными толстыми прослойками соединительной ткани. Отмечается сглаженность корково-мозговой границы, увеличение доли мозгового вещества, замещение паренхимы долек белой жировой тканью. Подобные признаки возрастных изменений в тимусе 12-месячных крыс были описаны Морозом [19], 6–10-месячных крыс — Москвичевым и соавт. [6].

Тимус крыс опытной группы на всех этапах наблюдения сохранял морфологические особенности органа, характерные для крыс контрольной группы: так же отмечалось разрастание соединительнотканного компонента капсулы и междольковых перегородок и замещение части паренхимы жировой тканью. Но при большем увеличении микроскопа были выявлены изменения клеточного состава структурно-функциональных зон паренхимы.

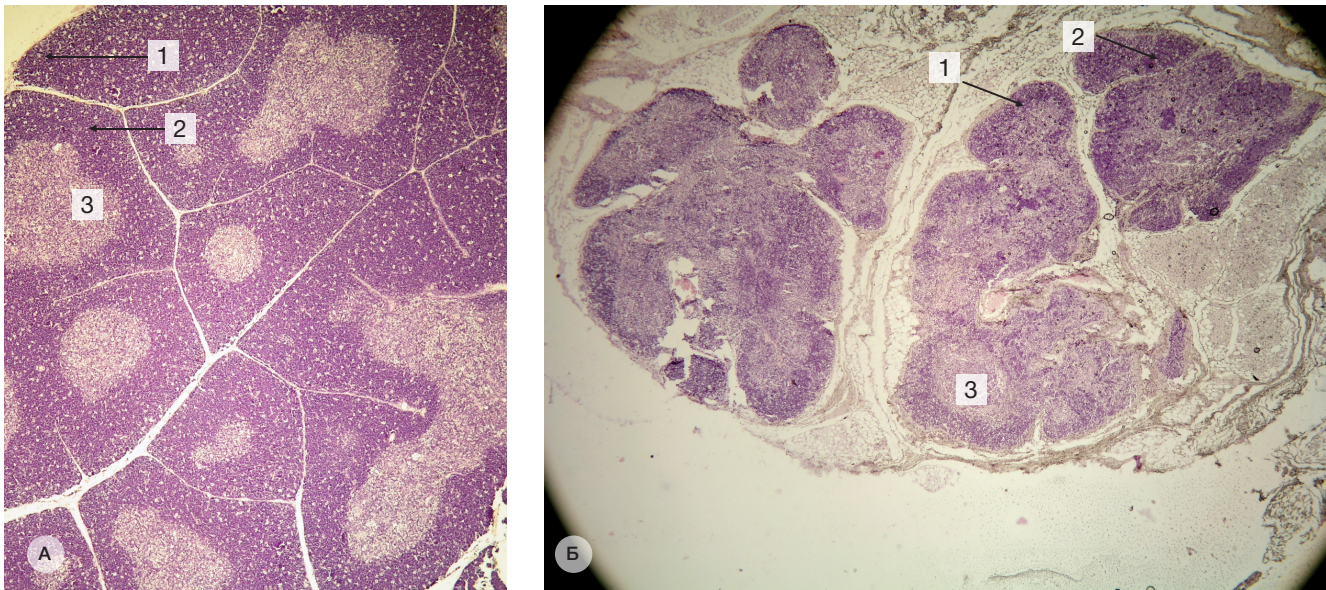


Рис. 1. Возрастная инволюция тимуса белых беспородных крыс-самцов

Микрофотографии среза тимуса самцов крысы в период полового созревания (А) и в возрасте 20 мес. (Б) через сутки после введения физиологического раствора. 1 — субкапсулярная зона коркового вещества, 2 — внутренняя зона коркового вещества, 3 — мозговое вещество. Окраска: гематоксилин-эозин. Объектив: PlanC N x10/0,25 ∞/-/FN22. Приближение: zoom 132.

В петлях стромы субкапсулярной зоны коркового вещества паренхимы тимуса крыс опытной группы, образованной сетью эпителиоретикулярных клеток и макрофагами, были расположены в несколько слоев лимфоидные клетки округлой формы, представленные в основном малыми и средними лимфоцитами, а также большими лимфоцитами и лимфобластами. Изредка встречались митотически делящиеся клетки. Эпителиоретикулярные клетки имели большие размеры и более светлую цитоплазму по сравнению с лимфоцитами, а также неправильную уплощенную форму. Макрофаги были крупными, неправильной отростчатой формы с типичной «пенистой» цитоплазмой. Кроме того, обнаруживались клетки лимфоидного ряда с признаками деструкции (гиперконденсированный хроматин в сморщенном ядре). Было отмечено увеличение в сравнении с контролем числа клеток лимфоидного ряда и макрофагов при одновременном снижении числа клеток с признаками деструкции (рис. 2). Однако показатели были статистически значимыми только для животных, декапитированных на 7, 15 и 30-е сутки после последнего введения «Имунофана». Характерно, что содержание эпителиоретикулярных клеток не отличалось достоверно от контрольных значений ни в одной из опытных подгрупп.

Внутренняя зона коркового вещества отличалась максимальной плотностью расположения клеток. Она была представлена несколькими слоями средних и малых лимфоцитов, иногда — в процессе митотического деления, располагавшихся в сети, образованной эпителиоретикулярными клетками и макрофагами. Встречались также лимфоидные клетки с признаками деструкции ядра и цитоплазмы. Изменения клеточного состава внутренней зоны были аналогичны тем, что отмечались в субкапсулярной зоне. Через сутки после введения «Имунофана» на 8,5 % увеличилось содержание средних лимфоцитов и на 48,0 % уменьшилось содержание деструктивно измененных клеток ($p < 0,05$) (рис. 3). При декапитации на 7-е сутки выявили большее количество средних и малых лимфоцитов, митотически делящихся клеток, макрофагов, а меньшее — клеток эпителиоретикулярной стромы (на 15,8 %)

и клеток с признаками деструкции (на 62,2 %). На 15-е сутки наблюдали те же закономерности, что и неделей ранее, однако увеличение содержания средних лимфоцитов не было статистически значимым. На 30-е сутки отклонение от значений показателей в группе контрольных животных в положительную сторону было характерно только для малых лимфоцитов (11,3 %) и макрофагов (51,3 %), в отрицательную — для эпителиоретикулярных и деструктивно измененных клеток (14,9 и 23,1 % соответственно). При декапитации на 60-е сутки статистически значимых отличий не обнаружили.

Мозговое вещество отличалось от коркового сниженной плотностью расположения лимфоидных клеток, представленных преимущественно малыми и средними

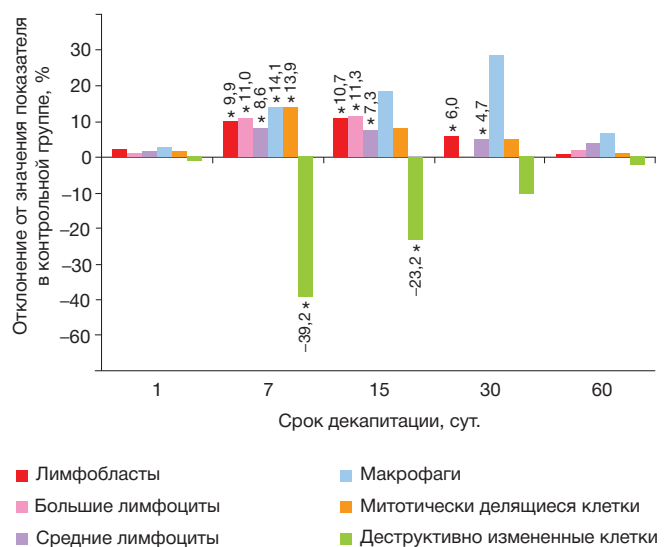


Рис. 2. Изменения в клеточном составе субкапсулярной зоны коркового вещества паренхимы тимуса крыс периода выраженных старческих изменений в зависимости от продолжительности воздействия на организм имуномодулятора «Имунофан»

* — $p < 0,05$ при сравнении опытной и контрольной групп.

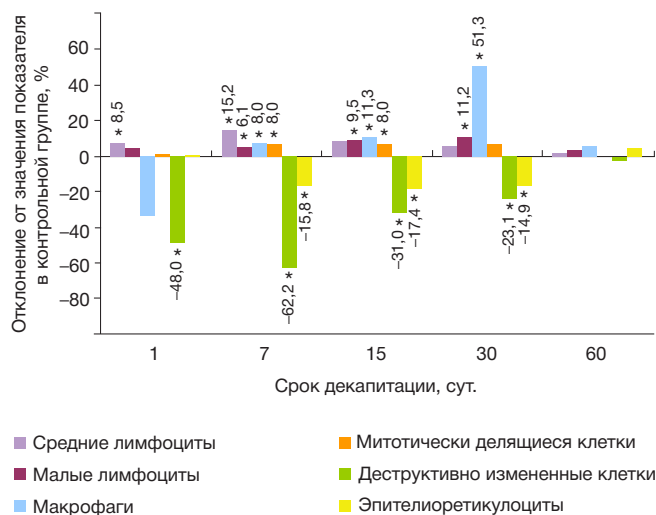


Рис. 3. Изменения в клеточном составе внутренней зоны коркового вещества паренхимы тимуса крыс периода выраженных старческих изменений в зависимости от продолжительности воздействия на организм иммуномодулятора «Имунофан»

* — $p < 0,05$ при сравнении опытной и контрольной групп.

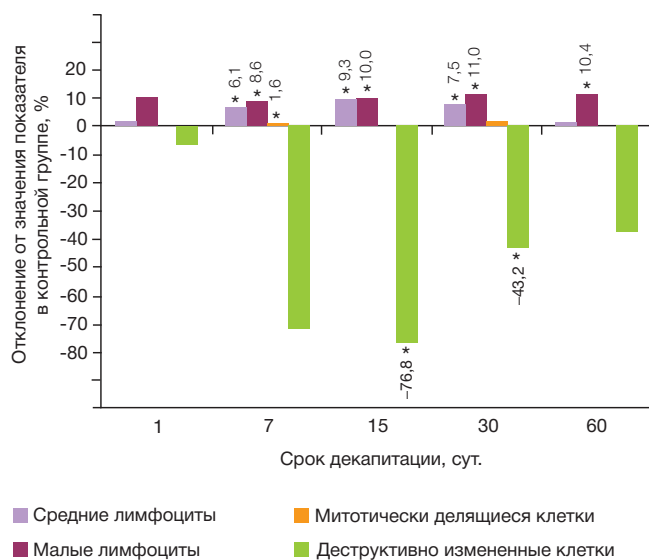


Рис. 4. Изменения в клеточном составе мозгового вещества тимуса крыс периода выраженных старческих изменений в зависимости от продолжительности воздействия на организм иммуномодулятора «Имунофан»

* — $p < 0,05$ при сравнении опытной и контрольной групп.

лимфоцитами. Здесь содержалась более густая, чем в корковом веществе, сеть крупных эпителиоретикулярных клеток, расположенных в виде тяжей или скоплений. Лимфобласты и большие лимфоциты не были обнаружены в мозговом веществе; содержание средних лимфоцитов было достоверно выше на 7, 15 и 30-е сутки наблюдения (на 6,1, 9,3 и 7,5 % соответственно), а содержание малых лимфоцитов — на 7 (8,6 %), 15 (10,0 %), 30 (11,0 %) и 60-е сутки (10,4 %) (рис. 4). Содержание митотически делящихся клеток незначительно превышало контрольный уровень лишь на 7-е сутки. Количество же деструктивно изменен-

ных клеток значительно уменьшилось на 15 и 30-е сутки. Отличия в содержании эпителиоретикулярных клеток и макрофагов были недостоверны.

К моменту окончания эксперимента (60-е сутки) численность малых и средних лимфоцитов, молодых форм клеток, митотически делящихся клеток и макрофагов уменьшалась и в целом достигала значения, выявленного для контрольных животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты свидетельствуют о заметной реактивности тимуса крыс периода выраженных старческих изменений на введение иммуномодулятора «Имунофан». Схожие изменения клеточного состава в субкапсулярной и внутренней зонах коркового вещества тимуса свидетельствуют о вовлечении в перестройку цитоархитектоники всего коркового вещества. Мозговое вещество является наиболее ареактогенной зоной паренхимы тимуса [17], однако его клеточный состав у крыс опытной группы претерпевал изменения. Возможным механизмом иммуностимулирующего эффекта препарата (временного частичного замедление возрастной инволюции тимуса) может являться поддержание и/или восстановление популяции как лимфоидных клеток, так и клеток микроокружения, в частности макрофагов. Число эпителиоретикулярных клеток в субкапсулярной зоне и мозговом веществе статистически достоверно не изменялось, и это дает возможность предположить, что имунофан не угнетает резервные возможности тимуса.

Изменения цитоархитектоники паренхимы тимуса, заключающиеся в повышении плотности клеточной популяции во всех изученных структурно-функциональных зонах, увеличении содержания клеток лимфоидного ряда, в том числе молодых форм, могут свидетельствовать о более активном поступлении в тимус клеток-предшественниц из красного костного мозга и об усилении внутритимической пролиферации лимфоцитов. Такое кратковременное стимулирующее влияние на тимус некоторые авторы наблюдали для другого иммуномодулятора — «Полиоксидония» [4, 6]. Захаров [3] указывает на замедление естественных инволютивных процессов в тимусе половозрелых лабораторных крыс после введения «Имунофана».

ВЫВОДЫ

Для тимуса крыс периода выраженных старческих изменений была характерна заметная реактивность на введение «Имунофана». Курс инъекций терапевтических доз препарата животным способствовал восстановлению структуры тимуса, тем самым замедляя возрастную инволюцию органа. Наличие тесной взаимосвязи между различными клеточными компонентами тимуса определяет необходимость изучения баланса между лимфоцитами тимуса и структурами микроокружения в условиях воздействия на организм лабораторных животных иммуностимулирующих препаратов.

Литература

1. Михайлова М. Н. Морфофункциональные изменения тимуса и показатели крови после введения циклофосфана, имунофана и их комбинации [диссертация]. М.: Московская медицинская академия имени И. М. Сеченова; 2004.
2. Шаршембиев Ж. А. Особенности строения тимуса при воздействии полиоксидония. Морфология. 2004; 125 (2): 59–60.
3. Захаров А. А. Изменение в структуре тимуса белых крыс после применения имунофана. Морфология. 2008; 2 (3): 34–8.
4. Стручко Г. Ю., Меркулова Л. М., Москвичев Е. В., Кострова О. Ю., Михайлова М. Н., Мухаммад Захид и др. Морфологические изменения тимуса после применения полиоксидония. Фундаментальные исследования. 2012; 5 (1): 197–202.
5. Лосева Л. Ф., Лебединская Е. А., Лебединская О. В. Морфогистохимические аспекты изменений в тимусе мышей под влиянием иммуностимулирующих препаратов на фоне индуцированной иммуносупрессии. Фундаментальные исследования. 2008; 10: 78.
6. Москвичев Е. В., Меркулова Л. М., Стручко Г. Ю., Михайлова М. Н., Кострова О. Ю. Влияние курсового введения иммуномодулятора «полиоксидоний» на течение возрастной инволюции тимуса. Современные проблемы науки и образования. 2013; 3. Доступно по ссылке: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=9374>.
7. Мухаммад Захид, Стручко Г. Ю., Москвичев Е. В. Морфофункциональное состояние тимуса при введении иммуномодулятора «Полиоксидоний». Вестник ЧГПУ им. И. Я. Яковлева. 2011; 4 (72): 88–93.
8. Лебедев В. В., Покровский В. И. Имунофан — синтетический пептидный препарат нового поколения. Вестник РАМН. 1999; 4: 56–61.
9. Бажигитова Б. Б., Шортанбаев А. А. Динамика иммунологических показателей у больных с частыми повторными заболеваниями респираторного тракта в результате применения имунофана. Inter J Immunorehabilitation. 2003; 5 (2): 205.
10. Венедиктова М. Г. Применение тактивина и имунофана при лечении больных аденокарциномой эндометрия. Эксперим. и клинич. фармакол. 2001; 64 (5): 46–9.
11. Забродский П. Ф., Германчук В. Г., Нодель М. Л., Василенко О. А., Аредаков О. Н. Влияние имунофана на показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов после острых отравлений токсичными химическими веществами. Эксперим. и клинич. фармакол. 2004; 67 (5): 28–30.
12. Кащенко С. А., Морозова Е. Н. Особенности морфометрических параметров лимфатических узлов пейеровых бляшек тонкой кишки крыс под влиянием имунофана. Украинский морфологический альманах. 2011; 9 (2): 34–6.
13. Западнюк В. И., Западнюк И. П., Захария Е. А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев: Изд-во «Вища школа»; 1983. 254 с.
14. Волошин М. А., Чайковский Ю. Б., Куц О. Г. Основы иммунологии та имуноморфології. Запоріжжя-Київ; 2010. 170 с.
15. Овчаренко В. В., Маврич В. В., авторы. Комп'ютерна програма для морфометричних досліджень «Morpholog» [патент]. № 9604 от 19.03.2004 (Украина).
16. Кащенко С. А., Золотарева М. В. Изменения морфометрических показателей белой пульпы селезенки крыс под воздействием иммуностимулирующих препаратов. Украинский медицинский альманах. 2011; 14 (5): 74–7.
17. Кривенцов М. А. Структурная организация тимуса крыс раннего постнатального периода при парентеральном введении спинномозговой жидкости. Украинский медицинский альманах. 2013; 16 (2): 40–2.
18. Бобрышева И. В. Морфофункциональные особенности тимуса крыс различных возрастных периодов в норме и после экспериментальной иммуностимуляции. Морфология. 2013; 7 (4): 11–7.
19. Мороз Г. А. Морфофункциональные особенности тимуса двенадцатимесячных крыс при многократно повторяющемся гипергравитационном воздействии. Морфология. 2010; IV (3): 23–7.
10. Venediktova MG. Primenenie taktivina i imunofana pri lechenii bol'nykh adenokartsinomoy endometriya. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2001; 64 (5): 46–9. Russian.
11. Zabrodskiy PF, Germanchuk VG, Nodel ML, Vasilenko OA, Aredakov ON. The effect of immunofan on the immunity system characteristics and lipid peroxidation parameters upon acute chemical poisoning. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2004; 67 (5): 28–30. Russian.
12. Kashchenko SA, Morozova EN. Features of morphometric parameters of lymphatic nodulus of rats' small intestine peyers patches after immunofan influence. Ukrains'kiy morfologichnyi al'manakh. 2011; 9 (2): 34–6. Russian.
13. Zapadnyuk VI, Zapadnyuk IP, Zakhariya EA. Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержание, ispol'zovanie v eksperimente. Kiev: Izd-vo "Vishcha shkola"; 1983. 254 p. Russian.
14. Voloshin MA, Chaykovskiy YuB, Kushch OG. Osnovi imunologii ta imunomorfologii. Zaporizhzhya-Kiiv; 2010. 170 p. Ukrainian.
15. Ovcharenko VV, Mavrich VV, inventors. Komp'yuterna programa dlya morfometrichnikh doslidzhen' «Morholog» [patent]. № 9604 dly 19.03.2004 (Ukraine).
16. Kashchenko SA, Zolotarevskaya MV. The changes of morphometric indexes of white pulp of rats' spleen under influence of immunomodulate drugs. Ukrains'kiy medichnyi al'manakh. 2011; 14 (5): 74–7. Russian.
17. Kriventsov MA. Structural organization of the thymus of the neonatal rats after parenteral administration of the cerebrospinal fluid. Ukrains'kiy medichnyi al'manakh. 2013; 16 (2): 40–2. Russian.
18. Bobrysheva IV. Morphological and functional features of the thymus of rats of different age periods in health and at experimental immunostimulation. Morfologiya. 2013; 7 (4): 11–7.
19. Moroz GA. Morfofunctional features of thymus of twelve-month-old rats exposed to repeated hypergravity. Morfologiya. 2010; IV (3): 23–7.

References

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ TLRs И АССОЦИИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА *DEFB1* У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

М. А. Зайцева^{1✉}, Б. Г. Брагвадзе¹, О. А. Свитич^{1,2}, Л. С. Намазова-Баранова³, Л. В. Ганковская¹

¹ Кафедра иммунологии, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Лаборатория молекулярной иммунологии, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва

³ Научный центр здоровья детей, Москва

Бронхиальная астма (БА) — одно из наиболее распространенных заболеваний органов дыхания. Активно исследуется роль элементов врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы, в частности, противомикробных пептидов. К ним относятся β -дефенсины, предотвращающие вторжение патогенов в слизистую оболочку респираторного тракта, наиболее активным из которых является β -дефенсин-1 (human beta defensin-1, HBD-1), кодируемый геном *DEFB1*. В исследовании была изучена ассоциация трех однонуклеотидных полиморфизмов в 5'-нетранслируемой области гена — *rs11362*, *rs1799946* и *rs1200972* — с бронхиальной астмой у детей. Также оценивали уровень экспрессии генов toll-подобных рецепторов *TLR2*, *TLR4* и *TLR9*. В опытную группу включили 48 пациентов в возрасте 3–7 лет с БА и 70 здоровых детей. Генотип AA полиморфизма *rs11362* и генотип CC полиморфизма *rs1799946* достоверно ассоциированы с заболеванием, а генотип GG полиморфизма *rs1799946* и генотип AA полиморфизма *rs120097* являются протективными. Генотип AA полиморфизма *rs11362* также ассоциирован с пониженной экспрессией, а генотип AG — с повышенной экспрессией гена β -дефенсина-1 *DEFB1*. У детей с БА выявили повышение уровня экспрессии гена *TLR2* в сравнении с контрольной группой в 19,5 раз, *TLR9* — в 9,5 раз, *TLR4* — в 8,3 раза.

Ключевые слова: бронхиальная астма, β -дефенсин-1, toll-подобные рецепторы, *DEFB1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, однонуклеотидный полиморфизм, полиморфный маркер

✉ Для корреспонденции: Зайцева Маргарита Алексеевна
143090, Московская область, г. Краснознаменск, ул. Связистов, д. 10, кв. 68; astice@list.ru

Статья получена: 14.06.2016 Статья принята в печать: 23.06.2016

ANALYSIS OF TLRs GENES EXPRESSION AND *DEFB1* POLYMORPHISMS ASSOCIATION IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA

Zaitseva MA^{1✉}, Bragvadze BG¹, Svitch OA^{1,2}, Namazova-Baranova LS³, Gankovskaya LV¹

¹ Department of Immunology, Biomedical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Laboratory of Molecular Immunology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

³ Scientific Center of Children's Health, Moscow, Russia

Bronchial asthma (BA) is one of the most common respiratory system diseases. The role of innate immunity components in the pathogenesis of bronchial asthma is studied widely, with particular focus on the antimicrobial peptides. Those include beta defensins that prevent pathogen intrusion into the respiratory tract mucosa, the most active of such pathogens being β -defensin-1 (human beta defensin-1, HBD-1) encoded by the *DEFB1* gene. We studied the association of three single nucleotide polymorphisms in the 5'- untranslated region of the gene, namely, *rs11362*, *rs1799946* and *rs1200972*, with bronchial asthma in children. We also evaluated gene expression of toll-like receptors *TLR2*, *TLR4* and *TLR9*. The experimental group included 48 patients of 3 to 7 years of age with BA and 70 healthy children. The AA genotype of the *rs11362* polymorphism and the CC genotype of the *rs1799946* polymorphism were reliably associated with the disease, while the GG genotype of the *rs1799946* polymorphism and the AA genotype of the *rs120097* polymorphism were found protective. Also, the AA genotype of the *rs11362* polymorphism was associated with the reduced expression of *DEFB1*, the human beta defensin-1 encoding gene, while the AG genotype was associated with its increased expression. In children with BA, *TLR2* expression increased 19.5 times in comparison with the controls; *TLR9* expression increased 9.5 times, while *TLR4* expression increased 8.3 times.

Keywords: bronchial asthma, human beta defensin-1, toll-like receptors, *DEFB1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, single nucleotide polymorphism, polymorphic marker

✉ Correspondence should be addressed: Margarita Zaitseva
ul. Svyazistov, d.10, kv. 68, Krasnoznamensk, Moscow oblast, Russia, 143090; astice@list.ru

Received: 14.06.2016 Accepted: 23.06.2016

Бронхиальная астма (БА) — это хроническое воспалительное заболевание верхних дыхательных путей, которое сопровождается обструкцией бронхов и их гиперреактивностью и проявляется эпизодами затруднения дыхания, хрипов, кашля, приступами удушья. Относится к числу патологий с высоким темпом роста заболеваемости, особенно в экономически развитых странах. По данным Российского респираторного общества, на сегодняшний день количество больных БА в России приближается к 10 млн человек, при этом доля детей среди них составляет более 20 % [1].

Замечено, что больные БА тяжелее переносят заболевания, вызванные респираторными инфекциями, нежели здоровые люди [2, 3]. С острыми респираторными инфекциями верхних дыхательных путей связана высокая частота обострений БА: около 85 % обострений у детей и 50 % — у взрослых вызываются именно респираторными вирусами [2]. Возбудители повреждают мерцательный эпителий слизистой оболочки дыхательного тракта, тем самым увеличивая ее проницаемость для аллергенов и токсических веществ и усиливая бронхиальную гиперреактивность. Тяжелое обострение может угрожать жизни больного, причем оно может развиваться при БА любой степени [3].

Многие современные исследования посвящены углубленному изучению патогенеза БА, в частности, роли элементов врожденного иммунитета. Активно изучают новый класс эффекторных молекул — противомикробные пептиды, к которым относятся β -дефенсины. Противомикробные свойства последних обусловлены электростатическим взаимодействием между отрицательно заряженными поверхностными компонентами бактериальной мембраны, такими как липополисахариды грамотрицательных бактерий и тейхоевые и липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, и положительно заряженной молекулой β -дефенсина. При критической концентрации β -дефенсинов на поверхности клетки-мишени в ее мембране образуются поры и происходит лизис клетки. Кроме того, β -дефенсины обладают иммунорегуляторной активностью: участвуют в хемотаксисе, индукции адаптивного иммунитета, созревании дендритных клеток и пр. [4].

Наиболее важную роль в защите слизистых оболочек респираторного тракта играет β -дефенсин-1 (human beta defensin-1, HBD-1), конститутивно синтезируемый эпителиальными клетками [5]. β -дефенсин-1 кодируется геном *DEFB1*, который расположен на коротком плече хромосомы 8 (8p23.1) в высокополиморфном кластере. Мутации в гене могут снижать его экспрессию, а недостаточная секреция β -дефенсинов вызывает ассоциированное прилипание и инвазию бактерий в слизистую и начало воспаления [6, 7].

Другой важный элемент врожденного иммунитета — toll-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLRs) эпителиальных клеток слизистой оболочки дыхательных путей, которые распознают патоген-ассоциированные молекулярные структуры (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, передают сигнал внутрь клетки и вызывают повышение функциональной активности лейкоцитов, а также экспрессию генов провоспалительных цитокинов и интерферонов. Наиболее широкий спектр бактериальных и вирусных патогенов распознается TLR2, TLR4, TLR9, которые могут активировать врожденный иммунитет локально, на уровне слизистых оболочек дыхательных путей.

Целью работы являлась комплексная оценка показате-

телей врожденного иммунитета — уровней экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *DEFB1*, а также изучение ассоциации некоторых однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP), локализованных в 5'-нетранслируемой области гена *DEFB1*, с бронхиальной астмой у детей. В качестве маркеров интереса выбрали три SNP: *rs1799946*, *rs1800972* и *rs11362*. Установлено, что они ассоциированы с ВИЧ-инфекцией, инфекциями, вызываемыми *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* и другими микроорганизмами, развитием сепсиса [8, 9], однако данные об их ассоциации с аллергическими заболеваниями отсутствуют.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие пациенты отделения восстановительного лечения детей с аллергическими заболеваниями и заболеваниями органов дыхания Научного центра здоровья детей (г. Москва): 48 детей в возрасте 3–7 лет с бронхиальной астмой. В контрольную группу включили 70 детей без заболеваний органов дыхания, инфекционно-воспалительных и аллергических заболеваний. В качестве клинического материала использовали соскобы со слизистой оболочки полости носа, взятые в период обострения БА на фоне острого респираторного заболевания.

Для исследования полиморфизмов гена *DEFB1* ДНК из клинического материала выделяли с использованием набора «АмплиПРАЙМ Рибо-сорб» («ИнтерЛабСервис», Россия) и ставили полимеразную цепную реакцию «в реальном времени» (ПЦР-РВ) с использованием набора «ПЦР-комплект» (в присутствии красителя SYBR Green I) («Синтол», Россия). Статистическую обработку данных проводили в MO Excel 2007 со статистическим пакетом Statistica 10.0 (StatSoft, США). Рассчитывали критерий согласия Пирсона и Odd Ratio (OR >1 — ассоциация генотипа с БА, OR <1 — протективный в отношении БА генотип) [10].

Уровень экспрессии генов *DEFB1*, *TLR2*, *TLR4* и *TLR9* исследовали относительно уровня экспрессии гена β -актина. РНК выделяли из клинического материала с использованием набора «АмплиПРАЙМ Рибо-сорб», проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора «ОТ-1» («Синтол») и ставили ПЦР-РВ с использованием набора «ПЦР-комплект» (в присутствии красителя SYBR Green I). При статистической обработке данных использовали критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Исследование было одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова. Родители подписали информированное согласие на участие детей в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распределение частот генотипов полиморфных маркеров *rs1799946*, *rs1800972* и *rs11362* гена *DEFB1* показало, что с риском развития бронхиальной астмы у детей ассоциированы генотипы AA маркера *rs11362* и CC маркера *rs1799946*, а генотипы GG и AA маркеров *rs1799946* и *rs1200972* соответственно являются протективными (рис. 1). Характер распределения частот аллелей гена *DEFB1* в обеих группах был сходным.

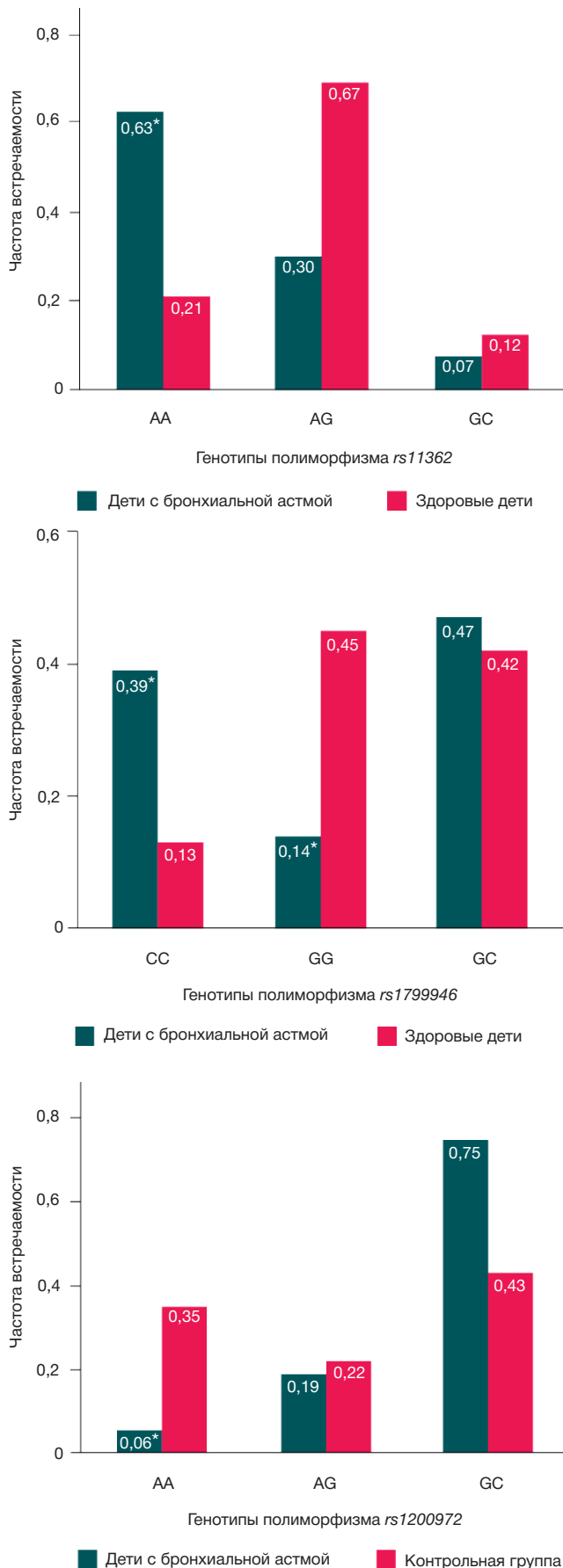


Рис. 1. Распределение частот генотипов однонуклеотидных полиморфизмов rs11362, rs1799946 и rs1200972 в гене *DEFB1* у детей с бронхиальной астмой (* — $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой)

Уровень экспрессии гена *DEFB1* у больных детей был в 3,5 раза ниже, чем у здоровых (рис. 2). Однонуклеотидная замена в промоторной области гена может повлиять на эффективность его транскрипции гена и количество синтезируемого белка. Мы разделили пациентов опытной группы на три подгруппы в соответствии с уровнями экспрессии гена β -дефенсина-1: с низкими (выше уровня экспрессии гена β -актина менее чем в 10 тыс. раз), средними (выше уровня экспрессии гена β -актина в 10–30 тыс. раз) и высокими (выше уровня экспрессии гена β -актина более чем в 30 тыс. раз). Было установлено, что генотип AG маркера rs11362 ассоциирован с увеличением уровня экспрессии β -дефенсина-1 в эпителиальных клетках. Так, частота генотипа AG в группах пациентов с высоким и низким уровнями экспрессии гена *DEFB1* составила 0,67 и 0,30 соответственно. Генотип AA ассоциирован с пониженной экспрессией гена дефенсина. Другие генотипы выбранных маркеров не ассоциированы с изменением уровня экспрессии гена дефенсина в исследованной нами группе.

У больных бронхиальной астмой выявили повышение уровня экспрессии гена *TLR2* в сравнении с контрольной группой в 19,5 раз, *TLR9* — в 9,5 раз, *TLR4* — в 8,3 раза. Результаты представлены в таблице.

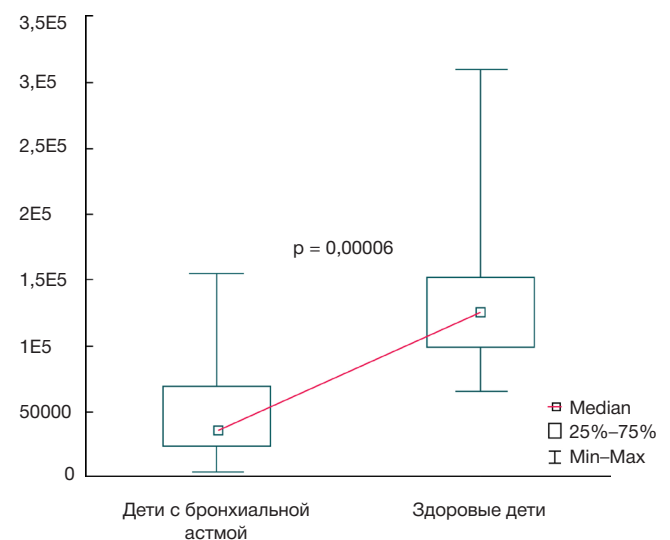


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *DEFB1* в эпителии слизистой носа у детей с бронхиальной астмой и здоровых детей (относительно уровня экспрессии гена β -актина)

Уровни экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *DEFB1* в эпителии слизистой носа у детей с бронхиальной астмой и здоровых детей

Ген	Дети с бронхиальной астмой	Здоровые дети
<i>TLR2</i>	130 000 (27 000; 270 000)	6 500 (5 000; 7 000)
<i>TLR4</i>	150 (30; 450)	18 (17; 120)
<i>TLR9</i>	30 000 (5 000; 50 000)	3 300 (3 000; 4 500)
<i>DEFB1</i>	35 000 (25 000; 68 000)	125 000 (100 000; 150 000)

Примечание: данные представлены в виде медианы (25 %; 75 %) в копиях кДНК на 1 млн копий кДНК β -актина, $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты могут указывать на то, что развитие хронического воспаления слизистой бронхов у детей с бронхиальной астмой отчасти обуславливается мутациями в 5'-нетранслируемой области гена *DEFB1*. На основании полученных данных об уровнях экспрессии генов *DEFB1* и *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* была выдвинута гипотеза о роли β -дефенсина-1 в патогенезе БА. Противомикробные пептиды, продуцируемые эпителием слизистой оболочки респираторного тракта, предотвращают вторжение патогенов в слизистую. Однако если продукция противомикробных пептидов снижена, а бактериальная нагрузка увеличена, то патогены распознаются TLRs эпителиальных клеток и запускается каскад провоспалительных реакций, в том числе индукция синтеза интерлейкинов (IL-1 β , IL-6, IL-12), интерферона α , интерферона β и хемокинов. Кроме того, через активацию эпителиальных TLRs индуцируется выработка тимусного стромального лимфопоэтина (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) и интерлейкина IL-33, которые взаимодействуют с дендритными клетками, увеличивают активность костимулирующих молекул CD40, CD80 и направляют дифференцировку клеток Th0 в Th2, а также напрямую взаимодействуют с тучными клетками, вызывая их дегрануляцию [11, 12]. Это приводит к развитию хронической воспалительной реакции (рис. 3).

ВЫВОДЫ

Генотип AA полиморфизма *rs11362* и генотип CC полиморфизма *rs1799946*, расположенных в 5'-нетранслируемой области гена *DEFB1*, достоверно ассоциированы с бронхиальной астмой у детей. Генотип GG полиморфизма *rs1799946* и генотип AA полиморфизма *rs120097* являются протективными. Генотип AA полиморфизма *rs11362* также ассоциирован с пониженной экспрессией, а генотип AG — с повышенной экспрессией гена β -дефенсина-1 *DEFB1*. Таким образом, некоторые мутации в гене *DEFB1* приводят к возникновению дисбаланса в системе врожденного иммунитета на уровне слизистой оболочки полости носа, который становится причиной частых обострений БА на фоне респираторных инфекций.

Литература

1. Чучалин А. Г., Оспельникова Т. П., Осипова Г. Л., Лизогуб Н. В., Гервазиева В. Б., Кривицкая В. З. и др. Роль респираторных инфекций в обострениях бронхиальной астмы. Пульмонология. 2007; (5): 32–4.
2. Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. J Exp Med. 2005 Mar 21; 201 (6): 937–47.
3. Cirillo I, Marsegia G, Klersy C, Ciprandi G. Allergic patients have more numerous and prolonged respiratory infections than nonallergic subjects. Allergy. 2007 Sep. 62 (9): 1087–90.
4. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Мешкова Р. Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. с. 148–65.
5. Свитич О. А., Ганковская Л. В., Рахманова И. В., Зайцева И. А., Ганковский В. А. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена β -дефенсина *DEFB1*, с гипертрофией аденоидных вегетаций. Вестн. РГМУ. 2012; (3): 59–62.
6. Noutsios GT, Floros J. Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. Swiss Med Wkly. 2014 Dec 24; 144: w14036.
7. Arslan F, Babakurban ST, Erbek SS, Sahin FI, Terzi YK. Chronic tonsillitis is not associated with beta defensin 1 gene polymorphisms in Turkish population. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2015 Apr; 79 (4): 557–60. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.01.028. Epub 2015 Jan 30.
8. Milanese M, Segat L, Pontillo A, Arraes LC, de Lima Filho JL, Crovella S. DEFB1 gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. AIDS. 2006 Aug 1; 20 (12): 1673–5.
9. Ганковская О. А., Бахарева И. В., Ганковская Л. В., Зверев В. В. Ассоциация полиморфных маркеров G(-20)A, C(-44)G и G(-52)A гена *DEFB1* с развитием преждевременных родов и внутриутробным инфицированием плода. Рос. иммунол. журн. 2011; 5 (1): 26–33.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.

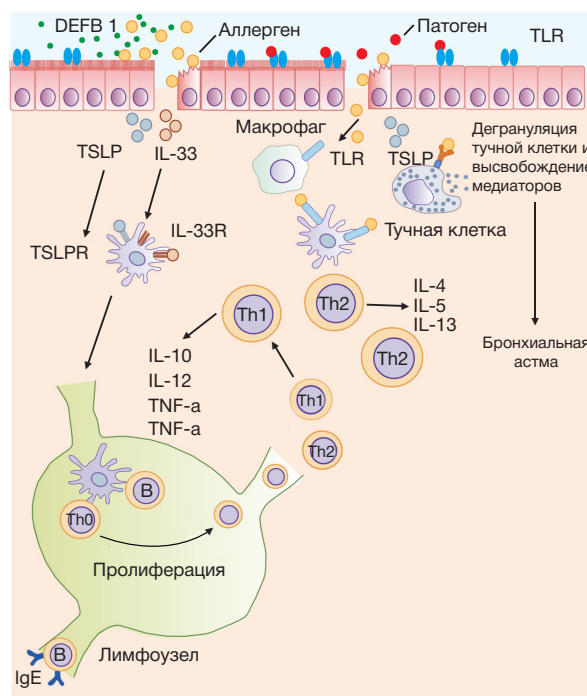


Рис. 3. Механизм развития хронической воспалительной реакции при бронхиальной астме

При первичном контакте слизистой с аллергеном нарушается эпителиальный барьер. Это приводит к продукции эпителиальными клетками таких цитокинов, как TSLP, IL-25 и IL-33. При повторном контакте с аллергеном в присутствии цитокинов индуцируется созревание дендритных клеток (ДК) и их миграция в лимфатические узлы, где ДК передают информацию об аллергене Т-хелперам Th0 с участием молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC-II), инициируя их пролиферацию и дифференцировку в Th-2. Активированные алергенспецифичные Th-2 продуцируют широкий спектр цитокинов: IL-4 (усиление пролиферации В-лимфоцитов, ростовой и дифференцировочный фактор В-лимфоцитов, переключение изотипа В-клеток на синтез иммуноглобулинов IgE), IL-5 (стимуляция пролиферации эозинофилов и высвобождения ими основного белка), IL-9 (активация тучных клеток). Алергенспецифичные IgE-антитела связываются с высокоаффинными рецепторами (FcεR1) на тучных клетках и базофилах и с низкоаффинными рецепторами (FcεR2) на эозинофилах и макрофагах. При повторном поступлении аллергенов в организм происходит их связывание с молекулами IgE, расположенными на мембранах тучных клеток, что обуславливает дегрануляцию этих клеток. При повышенной бактериальной нагрузке не все патогены элиминируются противомикробными пептидами. Часть из них распознается TLRs эпителия респираторного тракта, что приводит к поддержанию воспалительного процесса в бронхах.

11. Spann KM, Baturcam E, Schagen J, Jones C, Straub CP, Preston FM, et al. Viral and host factors determine innate immune responses in airway epithelial cells from children with wheeze and

atopy. *Thorax*. 2014 Oct. 69 (10): 918–25.

12. Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med*. 2012 May 4; 18 (5): 705–15.

References

1. Chuchalin AG, Ospel'nikova TP, Osipova GL, Lizogub NV, Gervazieva VB, Krivitskaya VZ, et al. Rol' respiratornykh infektsii v obostreniyakh bronkhial'noi astmy. *Pul'monologiya*. 2007; (5): 32–4. Russian.
2. Wark RA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med*. 2005 Mar 21; 201 (6): 937–47.
3. Cirillo I, Marseglia G, Klersy C, Ciprandi G. Allergic patients have more numerous and prolonged respiratory infections than nonallergic subjects. *Allergy*. 2007 Sep. 62 (9): 1087–90.
4. Koval'chuk LV, Gankovskaya LV, Meshkova RYa. *Klinicheskaya immunologiya i allergologiya s osnovami obshchei immunologii*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. p. 148–65. Russian.
5. Svitich OA, Gankovskaya LV, Rakhmanova IV, Zaitseva IA, Gankovskii VA. Assotsiatsiya polimorfnykh markerov, lokalizovannykh v 5'-netransliruemoi oblasti gena β -defensina DEFB1, s gipertrofiei adenoidnykh vegetatsii. *Vestnik RGMU*. 2012; (3): 59–62. Russian.
6. Noutsios GT, Floros J. Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Med Wkly*. 2014 Dec 24; 144: w14036.
7. Arslan F, Babakurban ST, Erbek SS, Sahin FI, Terzi YK. Chronic tonsillitis is not associated with beta defensin 1 gene polymorphisms in Turkish population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015 Apr; 79 (4): 557–60. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.01.028. Epub 2015 Jan 30.
8. Milanese M, Segat L, Pontillo A, Arraes LC, de Lima Filho JL, Crovella S. DEFB1 gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. *AIDS*. 2006 Aug 1; 20 (12): 1673–5.
9. Gankovskaya OA, Bakhareva IV, Gankovskaya LV, Zverev VV. Assotsiatsiya polimorfnykh markerov G(-20)A, C(-44)G i G(-52)A gena DEFB1 s razvitiem prezhdevremennykh rodov i vnutritrobnym infitsirovaniem ploda. *Russ J Immunol*. 2011; 5 (1): 26–33. Russian.
10. Glantz S. [Primer of biostatistics]. Moscow: Praktika, 1999. 459 p. Russian.
11. Spann KM, Baturcam E, Schagen J, Jones C, Straub CP, Preston FM, et al. Viral and host factors determine innate immune responses in airway epithelial cells from children with wheeze and atopy. *Thorax*. 2014 Oct. 69 (10): 918–25.
12. Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med*. 2012 May 4; 18 (5): 705–15.

ОШИБКИ ДИАГНОСТИКИ И ОСОБЕННОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ПЕРЕЛОМОВ КОСТЕЙ СТОПЫ ПРИ СОЧЕТАННОЙ И МНОЖЕСТВЕННОЙ ТРАВМЕ

М. А. Королёв [✉], Д. О. Ярмак, Е. А. Мирошникова, Ж. М. Молдакулов, А. В. Скороглядов, Г. В. Коробушкин

Кафедра травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Переломы костей стопы при множественной и сочетанной травме часто диагностируются поздно или не диагностируются вовсе, что обуславливает ненадлежащее лечение и его неудовлетворительный отдаленный результат. В статье сообщается о наиболее распространенных ошибках диагностики и лечения этой группы переломов. В исследовании, проведенном в 2007–2015 гг., участвовали 67 пациентов. Их разделили на группу проспективного наблюдения ($n = 31$) — опытную и группу ретроспективного наблюдения ($n = 36$) — контрольную. Для обеих групп диагностические и лечебные мероприятия были одинаковыми, но для опытной группы соблюдали некоторые принципы лечения: этапность, последовательность всех действий, зависимость от состояния конечности и общего состояния пациента. Выявили 40 и 69 переломов костей стоп для группы проспективного и группы ретроспективного наблюдения соответственно, при этом в первой были поздно диагностированы или не диагностированы 5 и 3 переломов, а во второй — 7 и 9. Наиболее частыми ошибками диагностики стали: невыполнение рентгенологического исследования, тяжесть общего состояния пациента, скудный анамнез. Часто пропуск перелома был обусловлен влиянием сразу нескольких факторов. В контрольной группе преобладало одноэтапное лечение повреждений (41 перелом), а в опытной — многоэтапное (30 переломов). Оценка результатов лечения по шкале Visual Analogue Scale достоверно выше (критерий Манна–Уитни равен 347) в группе проспективного наблюдения, что свидетельствует о более высоком качестве лечения пациентов группы. Исследование также показало, что применение малоинвазивных способов фиксации переломов костей стопы улучшает результат лечения.

Ключевые слова: переломы костей стопы, ошибки диагностики, сочетанная травма, множественная травма

✉ **Для корреспонденции:** Королёв Максим Александрович
117049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 10, корп. 7; doctorkoroleff@mail.ru

Статья поступила: 30.03.2016 Статья принята в печать: 22.04.2016

DIAGNOSTIC ERRORS AND MANAGEMENT OF FOOT FRACTURES IN PATIENTS WITH MULTIPLE OR CONCOMITANT INJURIES

Korolev MA [✉], Yarmak DO, Miroshnikova CA, Moldakulov JM, Skoroglyadov AV, Korobushkin GV

Department of Traumatology, Orthopedics and Field Surgery, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Delayed or missed diagnosis of foot fractures in patients with multiple or concomitant injuries often leads to the inadequate choice of treatment and causes serious long-term effects. This article reports the most common mistakes accompanying diagnostic procedures and therapy of this injury type. The study conducted in 2007–2015 enrolled 67 patients. Patients were divided into two groups: a prospective experimental group ($n = 31$) and a retrospective control group ($n = 36$). For both groups, diagnostic procedures and the range of therapeutic interventions applied were the same, but with the experimental group we used a stepped care approach, followed a specific sequence of activities and adjusted therapy considering the limb condition and the patient's overall state. In total, we identified 40 and 69 foot fractures in the prospective and retrospective groups, respectively. In the prospective group there were 5 delayed and 3 missed fracture diagnoses; in the second group those numbers were 7 and 9, respectively. The most common factors contributing to diagnostic errors were: excluding radiographic evaluation, severity of patient's overall condition, poor medical history. Missed fractures were often due to a combination of various factors. A one-step approach was prevalent in the controls (41 fractures); the experimental group underwent a multistep treatment (30 fractures). Therapy outcomes were assessed by Visual Analogue Scale. The results were statistically higher in the prospective group (Mann–Whitney U was 347), which indicates a better treatment applied in this group. The study also showed that using minimally invasive fixation for foot fractures improves treatment outcome.

Keywords: foot fractures, diagnostic error, concomitant injury, multiple injury

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim Korolev
Leningy prospect, d. 10, korp. 7, Moscow, Russia, 117049; doctorkoroleff@mail.ru

Received: 30.03.2016 Accepted: 22.04.2016

По некоторым оценкам, доля переломов костей стопы в структуре переломов скелета составляет 17–20 % [1]. При этом частота встречаемости переломов костей стопы возрастает среди пациентов с множественными и сочетанными травмами. Так, мы проанализировали статистику

травматологического отделения Городской клинической больницы № 1 имени Н. И. Пирогова в Москве, где в 2007–2015 гг. были зарегистрированы 923 пациента с множественными и сочетанными травмами, и обнаружили, что у 15 % из них были диагностированы переломы костей

стопы, тогда как в структуре переломов скелета всех пациентов отделения за тот же период этот показатель был равен 7 %. По всей видимости, это связано с тем, что значительная часть множественных и сочетанных травм является результатом автомобильных катастроф, в которых часто страдают конечности [2–4].

Другая особенность переломов костей стопы — высокая частота их поздней диагностики [5]. Так, в исследовании Guly на переломы пришлось до 79,7 % поздно диагностированных повреждений, и 11 % из них были локализованы на стопе [6]. В результате несвоевременного выявления травм стопы снижается эффективность и увеличивается продолжительность их лечения [5, 7], у пациентов появляется стойкий болевой синдром [8], снижается качество жизни [9]. Все это указывает на необходимость совершенствовать диагностический и терапевтический подходы к этой группе переломов.

Первый этап стандартной помощи пациенту заключается в устранении жизнеугрожающего состояния, которое переломами костей стопы, как правило, не вызывается (хотя в перспективе они могут значительно ухудшить результат общего лечения) [5]. После проведения реанимационных мероприятий, экстренных операций по жизненным показаниям и стабилизации состояния пациента травматолог может произвести повторный осмотр для выявления скрытых повреждений костей и мягких тканей конечностей [10]. Rizoli и соавт. отмечают важность повторных осмотров, так как в их работе около 30 % повреждений были диагностированы после активных жалоб самого пациента [11].

Важными диагностическими приемами являются методы визуализации повреждений: ультразвуковое исследование (УЗИ), рентгенограмма, компьютерная (КТ) или магнитно-резонансная томография (МРТ). Atilla и соавт. предлагают выполнять УЗИ пациентам с травмами стопы и голеностопного сустава, оценивая его как хороший метод для выявления переломов лодыжки и пятой плюсневой кости, но не для других костей стопы [12]. Рентгенологическое исследование некоторые авторы оценивают как низкоэффективное [13], в то время как КТ многие рекомендуют обязательно выполнять [14–17]. Это объясняется высокой точностью исследования и одновременно удобством его проведения: многим пациентам с тяжелыми травмами назначают КТ по поводу повреждений других областей тела и достаточно включить стопу в их число при наличии показаний [17]. Магнитно-резонансная томография демонстрирует высокую эффективность при выявлении повреждений мягких тканей — разрывов связок, сухожилий, мышц, а также при трансхондральных переломах костей стопы, невидимых на рентгенограммах [18].

Перспективным методом диагностики и, при необходимости, лечения является артроскопическое исследование. Оно применимо в первую очередь для таранной кости в связи с размером голеностопного сустава и относительной простотой доступа к нему [19], хотя уже есть данные о выполнении артроскопии на других костях стопы [20–22].

Некачественная диагностика и/или лечение могут стать также причиной судебного разбирательства между пациентом и врачом. В 2010 г. только в Москве в гражданском судопроизводстве оказалось 125 дел по поводу качества оказания медицинской помощи [23], а в 2013 г. — уже 325, и в 58,5 % случаев иск пациента был удовлетворен [24]. При лечении переломов костей стопы травматологи-ортопеды оказываются в зоне «юридического риска», поскольку в России до сих пор отсутствуют

клинические рекомендации для переломов этой группы. Методы лечения, указанные в стандартах для патологий других локализаций [25], не связаны между собой и не могут быть оправданием для врача в случае разбирательства.

Таким образом, диагностика и лечение переломов костей стопы у пациентов с политравмой затрагивает проблемы как медицинского, так и юридического характера. В связи с этим целью исследования являлось рассмотрение основных ошибок диагностики и лечения повреждений стопы у пациентов с множественными и сочетанными травмами, а также выработка рекомендаций для уменьшения риска недодиагностирования переломов и оптимизации их лечения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено в 2007–2015 гг. на базе травматологического отделения ГКБ № 1 им. Н. И. Пирогова в Москве. Его участниками стали 67 пациентов отделения с множественными и сочетанными травмами, в том числе переломами костей стопы. Критериями исключения являлись: ранний летальный исход, вывихи костей стопы или отказ пациента от участия в исследовании. Были сформированы две группы: проспективного наблюдения ($n = 31$, 22 мужчины и 9 женщин, средний возраст — 38 лет) и ретроспективного наблюдения, которая являлась контрольной ($n = 36$, 29 мужчин и 7 женщин, средний возраст — 41 год). Причинами травматизма для групп проспективного и ретроспективного наблюдения были дорожно-транспортные происшествия (81,2 и 74,7 % соответственно), падения с высоты (8,3 и 12,0 %) и другие (11,5 и 13,3 %).

Диагностические и лечебные мероприятия для двух групп были одинаковыми, однако в группе проспективного наблюдения мы имели возможность корректировать лечение и придерживаться важных лечебно-тактических принципов — этапности, последовательности всех действий, зависимости от состояния конечности общего состояния пациента. Ход и качество диагностики и лечения пациентов из группы ретроспективного наблюдения оценивали на основе данных историй болезни, телефонных опросов и личных осмотров.

Клинический осмотр включал оценку наличия и выраженности отека, деформации, болезненности и патологической подвижности стопы (последнее — с осторожностью). Острые нейрциркуляторные расстройства выявляли пальпацией с визированием пульсовой волны по дорсальным артериям стоп, чувствительность — внешним раздражением, локальную кожную температуру сравнивали с температурой тела. Рентгенограммы выполняли в двух проекциях для переломов любой локализации, для таранной и пяточной кости — в специальной проекции (при необходимости). КТ-исследование выполняли для уточнения характера переломов костей стопы, коррекции тактики лечения и предоперационного планирования. При повреждениях капсульно-связочного аппарата и хрящевых поверхностей костей выполняли МРТ-исследование.

Перелом считали рано диагностированным, если он был выявлен при первичном осмотре пациента либо в течение половины срока сращения поврежденных костей. К поздно диагностированным относили переломы, обнаруженные в иное время, но до выписки из стационара. Не диагностированным считали перелом, найденный в процессе амбулаторного лечения в травматологическом пункте.

Ведущим критерием для принятия решения об оперативном лечении переломов костей стопы у пациентов с множественной или сочетанной травмой являлось их общее состояние. Оперативная активность не должна была мешать проведению реанимационных мероприятий и устранению жизнеугрожающих состояний. Также от нее отказывались при высоком анестезиологическом риске.

Закрытые переломы костей стопы без смещения фиксировали с помощью гипсовых лонгет и повязок. При наличии угрозы вторичного смещения отломков, что часто происходит при переломах костей плюсны и пальцев, использовали малоинвазивные техники лечения: закрытую репозицию, фиксацию спицами, винтами или пластинами.

Открытые переломы костей стопы являлись абсолютным показанием к операции. Объем вмешательства был обратно пропорционален тяжести состояния пациента.

При наличии перелома со смещением заднего отдела стопы (пяточной кости, таранной кости) прибегали к оперативному лечению: открытой репозиции, остеосинтезу пластинами и винтами либо только винтами. В случае, когда с момента получения травмы проходило более 14 суток, для пяточной и таранной костей использовали только открытую репозицию с последующим остеосинтезом фиксаторами, а в более ранние сроки — закрытую репозицию с остеосинтезом фиксаторами.

Под одноэтапным лечением подразумевали лечение с одним лечебным действием, а под многоэтапным — лечение с первичной стабилизацией перелома щадящим способом (наложение гипса, использование аппарата наружной фиксации, лейкопластырная фиксация) с последующим переходом на более сложные и стабильные конструкции (пластины, винты, штифты).

Результаты лечения оценивали с использованием шкал SF-36 (Short Form 36), AOFAS (American Orthopaedic Foot and Ankle Society Score), FFI (Five-Factor Inventory), VAS (Visual Analogue Scale), а также разработанных на кафедре травматологии и ортопедии РНИМУ им. Н. И. Пирогова MFTS (Moscow Foot Trauma Scale) и AQSA (Abbreviated Questionnaire of Subjective Assessment) [26]. Оценку производили через 1, 3, 6 и 12 месяцев с момента окончания лечения, далее — 1 раз в год.

Для всех показателей рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Для оценки значимости различий средних значений показателей и корреляционных

связей между ними рассчитали коэффициент корреляции Спирмена (r) и критерий согласия Пирсона (с учетом поправки Йейтса, критерия Чупрова и критерия Крамера). Поскольку многие выборки между ними были несимметричны и распределение в них отличалось от нормального, вместо коэффициента Стьюдента использовали U-критерий Манна–Уитни.

Исследование было одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (протокол № 139 от 10.11.2014). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний срок наблюдения за пациентом составил 4 года. Всего было выявлено 109 переломов костей на 71 стопе, из них 40 (в том числе 6 открытых) — в группе проспективного наблюдения и 69 (в том числе 7 открытых) — в группе ретроспективного наблюдения (табл. 1). При этом в контрольной группе 53 перелома были диагностированы рано, 7 — поздно, а 9 — не были диагностированы. Для группы проспективного наблюдения эти показатели составили 32, 5 и 3 соответственно.

В обеих группах наибольшее количество переломов выявили при первичном осмотре травматологом — 27 и 36 в опытной и контрольной группах соответственно, что составило 67,5 и 52,1 % от общего числа переломов в группах (табл. 2). При повторных осмотрах в отделении реанимации и интенсивной терапии диагностировали 8 и 7 переломов (20,0 и 10,1 %), а после перевода в травматологическое отделение — 3 и 11 (7,5 и 15,9 %). Из 16 поздно диагностированных или не диагностированных переломов в группе ретроспективного наблюдения только для трех было выполнено рентгенологическое исследование (18,8 %), а из 8 таких переломов в группе проспективного наблюдения — для двух, причем в двух проекциях (25,0 %). КТ-исследование выполнили для 6 пациентов в опытной группе и для 3 — в контрольной, но в обеих группах пациенты с не диагностированными переломами не проходили КТ. Стоит отметить, что у 34 участников исследования из 67 с помощью КТ исследовали другие области тела, а у 12 — неоднократно в ходе динамического наблюдения.

Таблица 1. Общая характеристика опытной и контрольной групп исследования

Критерий		Группа проспективного наблюдения (n = 31)		Группа ретроспективного наблюдения (n = 36)	
		кол-во	доля, %	кол-во	доля, %
Число пациентов с сочетанной травмой (оценка по шкале ISS)	менее 16 б	5	16	2	5
	от 16 до 40 б	8	25	13	36
	более 40 б	0	0	0	0
Число пациентов с множественной травмой	до 2 переломов	4	12	5	13
	до 3 переломов	5	16	8	22
	более 3 переломов	9	29	8	22
Число пациентов с переломами костей стопы разной локализации	на правой стопе	15	48	16	44
	на левой стопе	9	29	14	38
	билатерально	7	22	6	16
Число переломов костей стопы по сроку диагностики	рано диагностированные	32	80	53	74
	поздно диагностированные	5	12	7	11
	не диагностированные	3	8	9	15

Наиболее частыми причинами пропуска переломов костей стопы при диагностике являлись невыполнение рентгенологического исследования, тяжесть состояния пациента, скудость анамнеза и др. (табл. 3).

В группе проспективного наблюдения 30 переломов костей стопы получили многоэтапное лечение, в группе ретроспективного наблюдения — только 16. Наложение гипсовых лонгет и повязок преобладало над оперативными вмешательствами: в опытной группе этот метод использовали для 10 переломов при одноэтапном лечении и для 17 — при многоэтапном лечении, а в контрольной — для 41 и 4 переломов соответственно. В ряду оперативных вмешательств в обеих группах были наиболее распространены фиксация спицами и наложение аппарата наружной фиксации. Остеосинтез костей стопы в экстренном порядке не выполняли ни в одной из групп.

Средние арифметические значения оценок по различным шкалам в группе проспективного наблюдения указывают на лучший результат лечения в сравнении с группой ретроспективного наблюдения (табл. 4). При этом в опытной группе значения стандартного отклонения для шкал меньше, чем в контрольной, что свидетельствует о более стабильном результате лечения. Однако статистически достоверными различия по значениям показателей являются лишь для шкалы VAS, поскольку критерий Манна-Уитни равен 347, т. е. находится в зоне значимости. Для шкалы FFI значение критерия (420) находится в зоне неопределенности, а для остальных шкал — в зоне незначимости. Коэффициент Спирмена для всех шкал, кроме VAS и FFI, указывает на ошибочность нулевой гипотезы о том, что ранняя диагностика не влияет на результаты лечения. Для не диагностированных переломов рассчитали коэффициент Пирсона. Его значение (2,517) демонстрирует наличие средней по силе связи, что говорит о вероятном наличии корреляции между оценочными значениями и о необходимости более ранней диагностики и иного, нежели в группе ретроспективного наблюдения, лечения. Коэффициент сопряженности, критерии Чупрова и Крамера указывают на слабую связь.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наиболее частыми причинами поздней диагностики или даже пропуска переломов костей стопы в нашем исследовании стали невыполнение рентгенологического исследования, тяжесть общего состояния пациента, скудные анамнестические данные. Важно, что во многих случаях перелом был поздно диагностирован в результате влияния сразу нескольких из указанных факторов. Guly и соавт. в качестве наиболее частых ошибок при диагностике переломов костей стопы называют некачественный анализ рентгенограмм и некачественно выполненное рентгенологическое исследование [6], а Houshian и соавт. — невнимательность травматолога и неправильную интерпретацию данных врачами-рентгенологами [27]. Brooks и соавт. сообщают о семи повреждениях, визуально различимых на рентгенограммах (все снимки были хорошего качества), но незамеченных травматологической службой [28]. В исследовании Shatta и соавт. порядок ошибок несколько иной: тяжесть состояния пациента, недооценка состояния пациента, неправильная интерпретация данных, полученных с помощью методов визуализации, и некачественно выполненные исследования [29]. Отличия от результатов других авторов, возможно, объясняются тем, что исследовали только летальные случаи.

Таблица 2. Обстоятельство выявления переломов костей стопы

Обстоятельство выявления перелома	Группа	Число переломов	Доля, %
Получение заключения рентгенолога	Р	33	47,8
	П	19	47,5
Получение результата КТ	Р	3	4,3
	П	6	15,0
Получение результата МРТ	Р	0	0,0
	П	2	5,0
Повторные осмотры в отделении реанимации и интенсивной терапии	Р	7	10,1
	П	8	20,0
После перевода в травматологическое отделение	Р	11	15,9
	П	3	7,5
После анализа рентгенограмм хирургом	Р	2	2,9
	П	0	0,0
После анализа рентгенограмм терапевтом	Р	0	0,0
	П	0	0,0
После жалоб пациента (первое обращение)	Р	3	4,3
	П	0	0,0
После жалоб пациента (повторное обращение)	Р	1	1,4
	П	0	0,0
После перевода в отделение хирургического профиля	Р	2	2,9
	П	0	0,0
После перевода в отделение терапевтического профиля	Р	0	0,0
	П	0	0,0
При наблюдении в кабинете долечивания	Р	1	1,4
	П	0	0,0
Не задокументированные случаи	Р	6	8,7
	П	2	5,0
ВСЕГО	Р	69	100,0
	П	40	100,0

Примечание: Р — группа ретроспективного наблюдения, П — группа проспективного наблюдения (опытная).

Таблица 3. Причины позднего выявления или пропуска переломов костей стопы

Причина ошибки	Группа проспективного наблюдения	Группа ретроспективного наблюдения
Невыполнение рентгенологического исследования	7	11
Тяжесть общего состояния	7	10
Скудные анамнестические данные	6	5
Отсутствие выраженных клинических признаков перелома	2	6
Недооценка травмы специалистом	2	5
Низкое качество рентгенограмм	2	4
Выявленные переломы костей стопы другой конечности	1	3
Кратковременность пребывания	3	1
Выявленные другие переломы на стопе	0	3
Другие	2	0

Примечание: в некоторых случаях один и тот же перелом был диагностирован ненадлежащим образом по нескольким причинам, поэтому абсолютное число поздно или не диагностированных переломов не совпадает с суммой переломов этих типов в таблице 1.

Таблица 4. Оценка результатов лечения с помощью стандартных шкал и опросников стопы

Показатель		SF-36		VAS	AOFAS	FFI	MFTS	AQSA
		PCS	MCS					
M	группа ретроспективного наблюдения	42,027	45,777	2,02	45,888	46,027	43,08	8,44
	группа проспективного удаления	43,032	48,032	1,03	51,225	34,61	45,93	6,9
SD	группа ретроспективного наблюдения	9,78	8,45	1,66	18,89	21,88	19,54	8,23
	группа проспективного удаления	9,63	8,31	1,04	19,121	17,45	19,98	7,06
Критерий Манна–Уитни		526	461	347	459	420	514	488
Коэффициент Спирмена		0,623	0,535	-0,05	0,494	0,138	0,641	0,698
Статистические показатели для группы не диагностированных переломов								
Критерий Пирсона		2,517						
	Поправка Йейтса	1,771						
	Коэффициент сопряженности	0,19						
	Критерий Чупрова	0,194						
	Критерий Крамера	0,194						

Примечание: M — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение.

Тяжесть общего состояния пациента, на наш взгляд, не должна мешать диагностике переломов костей стопы. Если тщательный осмотр в реанимационном зале невозможен, его необходимо выполнить позже — при втором и последующих осмотрах травматологом. Отсутствие анамнестических данных — не редкость при тяжелых травмах, но и признаки, свидетельствующие о повреждениях конечности, чаще всего характеризуются выраженным отеком, деформацией и болевой чувствительностью. Для повышения качества снимков и снижения числа не диагностированных переломов необходимо цифровое оборудование или техническая возможность передавать данные с рентгеноаппарата на компьютер, чтобы контролировать контрастность снимка и визуализировать более обширные области тела без потери качества изображения. К сожалению, не все стационары в России оснащены оборудованием нужного качества.

Важным методом диагностики переломов костей стопы, особенно эффективным при переломах таранной кости, является компьютерная томография [30–32]. Во врачебном сообществе также обсуждается вопрос назначения компьютерной томографии всего тела (Whole-Body CT, WBCT) пациентам с политравмой. В работе Davies и соавт. сообщается, что WBCT позволила диагностировать сочетанную травму в 16 % случаев, некоторые травматические изменения — в 42 % случаев, а еще в 42 % не выявила повреждений [17]. Основываясь на полученных результатах, исследователи рекомендуют назначать WBCT пациентам с политравмой только после тщательного анализа показаний к исследованию в связи с высокой лучевой нагрузкой (около 20 мЗв) и возможной малигнизацией тканей организма пациента.

В нашем исследовании мы также оценивали эффективность различных подходов к лечению переломов костей стопы. Что лучше: одноэтапное или многоэтапное лечение, малоинвазивная или полноценная фиксация переломов, срочное или отложенное вмешательство?

В травматологии существуют две основные концепции лечения пациентов с политравмой. Первая из них, Early Total Care (ETC), заключается в экстренной фиксации всех переломов независимо от состояния пациента [33]. Пахомов и соавт. указывают на то, что множественные переломы необходимо фиксировать одномоментно и одно-

этапно, правда, в их исследовании состояние пациентов было стабильным [14]. Вторая концепция, Damage control orthopedics (DCO), напротив, подразумевает восстановление организма пациента перед фиксацией переломов и концентрацию внимания врача в первую очередь на тяжелых повреждениях [34]. Однако у этого подхода также есть недостатки. Nicola отмечает, что при DCO снижается риск причинения вреда ранним медицинским вмешательством, но в то же время появляется необходимость в повторных операциях, которые могут быть менее эффективными, и возрастает продолжительность госпитализации пациента [35]. Результаты нашего исследования убеждают нас в том, что в отсутствие условий для раннего оперативного вмешательства его следует отложить до стабилизации состояния пациента.

Способов фиксации переломов костей стопы много: гипсовые лонгеты, лейкопластырные повязки, спицы, винты, пластины, штифты. Опыт нашего исследования свидетельствует о том, что критерием выбора должно быть состояние пациента. При стабильном состоянии больного многооскольчатые переломы пяточной и плюсневых костей со смещением отломков лучше фиксировать пластинами, т. к. они обеспечивают большую неподвижность костей. Для переломов фаланг могут быть использованы как лейкопластырная фиксация, так и спицы и мини-пластины. Однако при наличии противопоказаний (нестабильная гемодинамика, гипотермия, гипокоагуляция, выраженный отек, загрязненные раны в зоне интереса) разумно применять временные методы иммобилизации: гипсовые лонгеты, скелетное вытяжение, аппараты наружной фиксации и т. п. и только затем приступить к хирургической помощи.

Некоторые авторы в качестве метода фиксации переломов костей стопы предлагают наложение аппарата Илизарова и спице-стержневого аппарата наружной фиксации, особенно при переломах пяточной и таранной костей со смещением отломков [36–39]. В нашем исследовании аппарат Илизарова не использовали ни разу, что, по-видимому, объясняется несколькими причинами. Во-первых, отсутствием необходимого опыта у некоторых травматологов приемного отделения. Во-вторых, отсутствием показаний к его наложению, сложностями по установке и уходу за системой, а также относительной громоздкостью аппарата. Однако активно использовались

спице-стержневые аппараты наружной фиксации, чаще всего в качестве временной меры с дальнейшим переходом на погружные конструкции.

Другие авторы сообщают об эффективности наложения пластин [14, 40]. Мы считаем, что фиксация пластинами действительно является наиболее надежным методом, обеспечивая также минимум ухода за пациентом (при условии заживления послеоперационной раны и возобновления двигательной активности больного). Альтернативой пластинам может быть малоинвазивная фиксация винтами [41, 42].

ВЫВОДЫ

Диагностика переломов костей стопы у пациентов с множественной и сочетанной травмой осложняется в боль-

шинстве случаев поверхностным первым контактом врача с больным и тяжестью состояния, обусловленной сопутствующими повреждениями. Для повышения качества диагностики переломов костей стопы рентгенограммы интересующих отделов следует выполнять не менее чем в двух проекциях и, по возможности, в цифровом формате. При назначении компьютерной томографии по поводу повреждений других областей тела и при наличии признаков повреждений костей стопы или стоп (анамнез, механизм травмы, клинические признаки) их необходимо включать в сканирование для уточнения характера повреждения. Мы рекомендуем в лечении пациентов с переломами костей стоп в составе политравмы руководствоваться принципом этапности и отдавать предпочтение малоинвазивным методам фиксации, что может улучшить результат лечения, сократить время госпитализации и предупредить развитие осложнений.

Литература

1. Черкес-Заде Д. И., Каменев Ю. Ф. Хирургия стопы. 2-е изд. М.: Медицина; 2002. 328 с.
2. Parenteau CS, Viano DC, Lövsund P, Tingvall C. Foot-ankle injuries: influence of crash location, seating position and age. *Accid Anal Prev*. 1996 Sep; 28 (5): 607–17.
3. Fildes B, Lenard J, Lane J, Vulcan P, Seyer K. Lower limb injuries to passenger car occupants. *Accid Anal Prev*. 1997 Nov; 29 (6): 785–91.
4. Richter M, Thermann H, Wippermann B, Otte D, Schratz HE, Tschern H. Foot fractures in restrained front seat car occupants: a long-term study over twenty-three years. *J Orthop Trauma*. 2001; 15 (4): 287–93.
5. Ahrberg AB, Leimcke B, Tiemann AH, Josten C, Fakler JK. Missed foot fractures in polytrauma patients: a retrospective cohort study. *Patient Saf Surg*. 2014; 8 (1): 10. doi: 10.1186/1754-9493-8-10.
6. Guly HR. Diagnostic errors in an accident and emergency department. *Emerg Med J*. 2001; 18 (4): 263–9.
7. Judd DB, Kim DH. Foot fractures frequently misdiagnosed as ankle sprains. *Am Fam Physician*. 2002 Sep 1; 66 (5): 785–94.
8. Probst C, Richter M, Lefering R, Frink M, Gaulke R, Krettek C, et al. Incidence and significance of injuries to the foot and ankle in polytrauma patients — an analysis of the Trauma Registry of DGU. *Injury*. 2010; 41 (2): 210–5. Epub 2009 Nov 3.
9. Tran T, Thordarson D. Functional outcome of multiply injured patients with associated foot injury. *Foot Ankle Int*. 2002 Apr; 23 (4): 340–3.
10. Gebhard F, Huber-Lang M. Polytrauma — pathophysiology and management principles. *Langenbecks Arch Surg*. 2008 Nov; 393 (6): 825–31.
11. Rizoli SB, Boulanger BR, McLellan BA, Sharkey PW. Injuries missed during initial assessment of blunt trauma patients. *Accid Anal Prev*. 1994; 26: 681–6.
12. Atilla OD, Yesilaras M, Kilic TY, Tur FC, Reisoglu A, Sever M, et al. The accuracy of bedside ultrasonography as a diagnostic tool for fractures in the ankle and foot. *Acad Emerg Med*. 2014 Sep; 21 (9): 1058–61.
13. Ng CH, Lau FL. A retrospective review of patients with radiological missed fractures in an emergency department in Hong Kong. *Hong Kong J Emerg Med*. 2003 Oct; 10 (4): 215–22.
14. Пахомов И. А., Перих В. В., Борзых К. О., Фаламеева О. В. Диагностика и лечение сочетанных повреждений позвоночника и стоп. *Хирургия позвоночника*. 2008; 1: 8–13.
15. Bibbo C, Len SS, Abidi N, Berberian W, Grossman M, Gebauer G, et al. Missed and Associated Injuries after Subtalar Dislocation: The Role of CT. *Foot Ankle Int*. 2001; 22 (4): 324–8.
16. Zhang T, Chen W, Su Y, Wang H, Zhang Y. Does axial view still play an important role in dealing with calcaneal fractures? *BMC Surg*. 2015 Mar 8; 15: 19.
17. Davies RM, Scrimshire AB, Sweetman L, Anderton MJ, Holt EM. A decision tool for whole-body CT in major trauma that safely reduces unnecessary scanning and associated radiation risks: An initial exploratory analysis. *Injury*. 2016 Jan; 47 (1): 43–9. Epub 2015 Sep 1.
18. Sadineni RT, Pasumarthy A, Bellapa NC, Velicheti S. Imaging Patterns in MRI in Recent Bone Injuries Following Negative or Inconclusive Plain Radiographs. *J Clin Diagn Res*. 2015 Oct; 9 (10): TC10–3.
19. Takao M, Uchio Y, Shu N, Ochi M. Anatomic bases of ankle arthroscopy: study of superficial and deep peroneal nerves around anterolateral and antero-central approach. *Surg Radiol Anat*. 1998; 20 (5): 317–20.
20. Lui TH. Lateral foot pain following open reduction and internal fixation of the fracture of the fifth metatarsal tubercle: treated by arthroscopic arthrolysis and endoscopic tenolysis. *BMJ Case Rep*. 2014 Apr 17; 2014. pii: bcr2014204116.
21. Pastides PS, Milnes L, Rosenfeld PF. Percutaneous Arthroscopic Calcaneal Osteosynthesis: A Minimally Invasive Technique for Displaced Intra-Articular Calcaneal Fractures. *J Foot Ankle Surg*. 2015 Sep–Oct; 54 (5): 798–804.
22. Li HL, Li SY, Qi W, Li CB, Qu F, Guo Qi, et al. [Clinical effect of arthroscopy-assisted minimally invasive management of bunion]. *Zhongguo Gu Shang*. 2016 Feb; 29 (2): 138–41. Chinese.
23. Баринев У. Х., Жаров В. В., Черкалина Е. Н., Бобылева М. В., Косухина О. И. Динамика комиссионных судебно-медицинских экспертиз по гражданским делам в г. Москве за 2000–2010 гг. *Мед. эксперт. и право*. 2012; 3: 46–8.
24. Перепелкина И. О., Перепелкин Д. В., Смирнов Д. В. Споры и конфликтные ситуации в связи с ненадлежащим оказанием медицинской помощи и юридическая практика их разрешения. *Исслед. и практ. в мед.* 2015; 2 (1): 72–5.
25. Стандарты медицинской помощи [Интернет]. Москва: Министрство здравоохранения Российской Федерации; 2016 [дата обращения: март 2016 г.]. Доступно по ссылке: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/stranitsa-983>
26. Королёв М. А., Ярмач Д. О., Мирошникова Е. А., Коробушкин Г. В. Валидизация шкал MFTS и AQSA у больных с переломами костей стопы в составе множественной и сочетанной травмы. *Вестник РГМУ*. 2016; 2: 60–4.
27. Houshian S, Larsen MS, Holm C. Missed injuries in a level I trauma center. *J Trauma*. 2002 Apr; 52 (4): 715–9.
28. Brooks A, Holroyd B, Riley B. Missed injury in major trauma patients. *Injury*. 2004; 35 (4): 407–10.
29. Sharma BR, Gupta M, Harish D, Singh VP. Missed diagnoses in trauma patients vis-à-vis significance of autopsy. *Injury*. 2005; 36: 976–83.
30. Ардашев И. П., Стаценко О. А., Афонин Е. А., Калашников В. В., Калашников В. В., Воронкин Р. Г. Диагностика и лечение повреждений таранной кости. *Медицина в Кузбассе*. 2010; 1: 29–32.
31. Ежов М. Ю. Диагностика и лечение круартроза и посттрав-

- матического асептического некроза таранной кости. Мед. альманах. 2012; 1: 157–60.
32. Корышков Н. А. Рациональные методы диагностики и лечения повреждений стопы [диссертация]. М.: ЦИТО им. Н. Н. Приорова; 2005.
 33. Bone LB, McNamara K, Shine B, Border J. Mortality in multiple trauma patients with fractures. *J Trauma*. 1994 Aug; 37 (2): 262–4; discussion 264–5.
 34. Pape HC. Damage-control orthopedic surgery in polytrauma: influence on the clinical course and its pathogenetic background. In: Bentley G, editor. *European Instructional Lectures*. Vol. 9, 2009; 10th EFORT Congress, Vienna, Austria. Springer; 2009. p. 67–74.
 35. Nicola R. Early Total Care versus Damage Control: Current Concepts in the Orthopedic Care of Polytrauma Patients. *ISRN Orthop*. 2013; 2013: 329452.
 36. Рахманкулов Э. Н. Диагностика и комплексное лечение переломов пяточной кости со смещением отломков [диссертация]. Уфа: Башкирский государственный медицинский университет; 2001.
 37. Шлаганов Е. А., Лебединцев Е. А., Медведев Г. М., Шлаганов И. Е. Лечение переломов пяточной кости методом чрескостного остеосинтеза при производственном и бытовом травматизме. *Экол. чел.* 2006; 3: 56–60.
 38. Шигарев В. М., Зырянов С. Я. Наш взгляд на современное состояние проблемы лечения переломов таранной кости. *Гений ортопед*. 1998; 2: 25–8.
 39. Хан А. М. Лечение переломов пяточной кости аппаратом Илизарова [диссертация]. Казань: Казанская государственная медицинская академия; 2002.
 40. Thordarson DB, Latteier M. Open reduction and internal fixation of calcaneal fractures with a low profile titanium calcaneal perimeter plate. *Foot Ankle Int*. 2003 Mar; 24 (3): 217–21.
 41. Дмитриев О. А., Мирошникова Е. А., Коробушкин Г. В., Скорогладов А. В. Роль малоинвазивного остеосинтеза при лечении закрытых переломов пяточной кости. В сб.: *Материалы юбилейной научно-практической конференции ГКБ № 1 им. Н. И. Пирогова «Первая городская больница. 210 лет на страже здоровья»*; 1 ноября 2012 г.; Москва, Россия. М.; 2012. с. 290.
 42. Коробушкин Г. В., Скорогладов А. В., Мирошникова Е. А., Егизарян К. А., Дмитриев О. А., Королёв М. А. Малоинвазивный остеосинтез в лечении переломов пяточной кости. *Моск. хир. журн.* 2013; 3: 42–6.
- References**
1. Cherkas-Zade DI, Kamenev YuF. *Khirurgiya stopy*. 2nd ed. Moscow: Izdatelstvo Meditsina; 2002. 328 p. Russian.
 2. Parenteau CS, Viano DC, Lövsund P, Tingvall C. Foot-ankle injuries: influence of crash location, seating position and age. *Accid Anal Prev*. 1996 Sep; 28 (5): 607–17.
 3. Fildes B, Lenard J, Lane J, Vulcan P, Seyer K. Lower limb injuries to passenger car occupants. *Accid Anal Prev*. 1997 Nov; 29 (6): 785–91.
 4. Richter M, Thermann H, Wippermann B, Otte D, Schratz HE, Tscherne H. Foot fractures in restrained front seat car occupants: a long-term study over twenty-three years. *J Orthop Trauma*. 2001; 15 (4): 287–93.
 5. Ahrberg AB, Leimcke B, Tiemann AH, Josten C, Fakler JK. Missed foot fractures in polytrauma patients: a retrospective cohort study. *Patient Saf Surg*. 2014; 8 (1): 10. doi: 10.1186/1754-9493-8-10.
 6. Guly HR. Diagnostic errors in an accident and emergency department. *Emerg Med J*. 2001; 18 (4): 263–9.
 7. Judd DB, Kim DH. Foot fractures frequently misdiagnosed as ankle sprains. *Am Fam Physician*. 2002 Sep 1; 66 (5): 785–94.
 8. Probst C, Richter M, Lefering R, Frink M, Gaulke R, Krettek C, et al. Incidence and significance of injuries to the foot and ankle in polytrauma patients — an analysis of the Trauma Registry of DGU. *Injury*. 2010; 41 (2): 210–5. Epub 2009 Nov 3.
 9. Tran T, Thordarson D. Functional outcome of multiply injured patients with associated foot injury. *Foot Ankle Int*. 2002 Apr; 23 (4): 340–3.
 10. Gebhard F, Huber-Lang M. Polytrauma — pathophysiology and management principles. *Langenbecks Arch Surg*. 2008 Nov; 393 (6): 825–31.
 11. Rizoli SB, Boulanger BR, McLellan BA, Sharkey PW. Injuries missed during initial assessment of blunt trauma patients. *Accid Anal Prev*. 1994; 26: 681–6.
 12. Atilla OD, Yesilaras M, Kilic TY, Tur FC, Reisoglu A, Sever M, et al. The accuracy of bedside ultrasonography as a diagnostic tool for fractures in the ankle and foot. *Acad Emerg Med*. 2014 Sep; 21 (9): 1058–61.
 13. Ng CH, Lau FL. A retrospective review of patients with radiological missed fractures in an emergency department in Hong Kong. *Hong Kong J Emerg Med*. 2003 Oct; 10 (4): 215–22.
 14. Pakhomov IA, Rerikh VV, Borzykh KO, Falameeva OV. Diagnostika i lechenie sochetannykh povrezhdenii pozvonochnika i stop. *Khirurgiya pozvonochnika*. 2008; 1: 8–13. Russian.
 15. Bibbo C, Len SS, Abidi N, Berberian W, Grossman M, Gebauer G, et al. Missed and Associated Injuries after Subtalar Dislocation: The Role of CT. *Foot Ankle Int*. 2001; 22 (4): 324–8.
 16. Zhang T, Chen W, Su Y, Wang H, Zhang Y. Does axial view still play an important role in dealing with calcaneal fractures? *BMC Surg*. 2015 Mar 8; 15: 19.
 17. Davies RM, Scrimshire AB, Sweetman L, Anderton MJ, Holt EM. A decision tool for whole-body CT in major trauma that safely reduces unnecessary scanning and associated radiation risks: An initial exploratory analysis. *Injury*. 2016 Jan; 47 (1): 43–9. Epub 2015 Sep 1.
 18. Sadineni RT, Pasumarthy A, Bellapa NC, Velicheti S. Imaging Patterns in MRI in Recent Bone Injuries Following Negative or Inconclusive Plain Radiographs. *J Clin Diagn Res*. 2015 Oct; 9 (10): TC10–3.
 19. Takao M, Uchio Y, Shu N, Ochi M. Anatomic bases of ankle arthroscopy: study of superficial and deep peroneal nerves around anterolateral and antero-central approach. *Surg Radiol Anat*. 1998; 20 (5): 317–20.
 20. Lui TH. Lateral foot pain following open reduction and internal fixation of the fracture of the fifth metatarsal tubercle: treated by arthroscopic arthrolysis and endoscopic tenolysis. *BMJ Case Rep*. 2014 Apr 17; 2014. pii: bcr2014204116.
 21. Pastides PS, Milnes L, Rosenfeld PF. Percutaneous Arthroscopic Calcaneal Osteosynthesis: A Minimally Invasive Technique for Displaced Intra-Articular Calcaneal Fractures. *J Foot Ankle Surg*. 2015 Sep–Oct; 54 (5): 798–804.
 22. Li HL, Li SY, Qi W, Li CB, Qu F, Guo Qi, et al. [Clinical effect of arthroscopy-assisted minimally invasive management of bunion]. *Zhongguo Gu Shang*. 2016 Feb; 29 (2): 138–41. Chinese.
 23. Barinov UKh, Zharov VV, Cherkalina EN, Bobyleva MV, Kosukhina OI. Dinamika komissionnykh sudebno-meditsinskikh ekspertiz po grazhdanskim delam v g. Moskve za 2000–2010 gg. *Meditsinskaya ekspertiza i pravo*. 2012; 3: 46–8. Russian.
 24. Perepechina IO, Perepechin DV, Smirnova DV. Spory i konfliktnye situatsii v svyazi s nenadlezhashchim okazaniem meditsinskoi pomoshchi i yuridicheskaya praktika ikh razresheniya. *Issledovaniya i praktika v meditsine*. 2015; 2 (1): 72–5. Russian.
 25. Standarty meditsinskoi pomoshchi [Internet]. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii. c2016 [cited 2016 Mar]. Available from: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/stranitsa-983>. Russian.
 26. Korolev MA, Yarmak DO, Miroshnikova EA, Korobushkin GV. MFTS and AQSA scales validation in patients with multiple and concomitant foot fractures. *Bulletin of RSMU*. 2016; 2: 60–4.
 27. Houshian S, Larsen MS, Holm C. Missed injuries in a level I trauma center. *J Trauma*. 2002 Apr; 52 (4): 715–9.
 28. Brooks A, Holroyd B, Riley B. Missed injury in major trauma patients. *Injury*. 2004; 35 (4): 407–10.
 29. Sharma BR, Gupta M, Harish D, Singh VP. Missed diagnoses in

- trauma patients vis-à-vis significance of autopsy. *Injury*. 2005; 36: 976–83.
30. Ardashov IP, Statsenko OA, Afonin EA, Kalashnikov VV, Kalashnikov VV, Voronkin RG. Diagnostika i lechenie povrezhdenii tarannoi kosti. *Meditsina v Kuzbasse*. 2010; 1: 29–32. Russian.
 31. Ezhov MYu. Diagnostika i lechenie kruzartroza i posttravmaticheskogo asepticheskogo nekroza tarannoi kosti. *Meditsinskii al'manakh*. 2012; 1: 157–60. Russian.
 32. Koryshkov HA. Ratsional'nye metody diagnostiki i lecheniya povrezhdenii stopy [dissertation]. Moscow: Central Institute of Traumatology and Orthopaedics named after NN Priorov; 2005. Russian.
 33. Bone LB, McNamara K, Shine B, Border J. Mortality in multiple trauma patients with fractures. *J Trauma*. 1994 Aug; 37 (2): 262–4; discussion 264–5.
 34. Pape HC. Damage-control orthopedic surgery in polytrauma: influence on the clinical course and its pathogenetic background. In: Bentley G, editor. *European Instructional Lectures*. Vol. 9, 2009; 10th EFORT Congress, Vienna, Austria. Springer; 2009. p. 67–74.
 35. Nicola R. Early Total Care versus Damage Control: Current Concepts in the Orthopedic Care of Polytrauma Patients. *ISRN Orthop*. 2013; 2013: 329452.
 36. Rakhmankulov EN. Diagnostika i kompleksnoe lechenie perelomov pyatochnoi kosti so smeshcheniem otlomkov [dissertation]. Ufa: Bashkir State Medical University; 2001. Russian.
 37. Shlaganov EA, Lebedintsev EA, Medvedev GM, Shlaganov IE. Lechenie perelomov pyatochnoi kosti metodom chreskostnogo osteosinteza pri proizvodstvennom i bytovom travmatizme. *Ekologiya cheloveka*. 2006; 3: 56–60. Russian.
 38. Shigarev VM, Zyryanov SYa. Nash vzglyad na sovremennoe sostoyanie problemy lecheniya perelomov tarannoi kosti. *Genii ortopedii*. 1998; 2: 25–8. Russian.
 39. Khan AM. Lechenie perelomov pyatochnoi kosti apparatom Ilizarova [dissertation]. Kazan: Kazan State Medical Academy; 2002. Russian.
 40. Thordarson DB, Latteier M. Open reduction and internal fixation of calcaneal fractures with a low profile titanium calcaneal perimeter plate. *Foot Ankle Int*. 2003 Mar; 24 (3): 217–21.
 41. Dmitriev OA, Miroshnikova EA, Korobushkin GV, Skoroglyadov AV. Rol' maloinvazivnogo osteosinteza pri lechenii zakrytykh perelomov pyatochnoi kosti. In: *Materialy yubileinoi nauchno-prakticheskoi konferentsii GKB № 1 im. N. I. Pirogova «Pervaya gorodskaya bol'nitsa. 210 let na strazhe zdorov'ya»*; 2012 Nov. 1; Moscow, Russia. Moscow; 2012. p. 290. Russian.
 42. Korobushkin GV, Skoroglyadov AV, Miroshnikova EA, Egiazaryan KA, Dmitriev OA, Korolev MA. Maloinvazivnyi osteosintez v lechenii perelomov pyatochnoi kosti. *Moskovskii khirurgicheskii zhurnal*. 2013; 3: 42–6. Russian.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ У ДЕТЕЙ 8 И 10 ЛЕТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ПРОБЫ

Н. В. Бабошина ✉

Кафедра медицины, биологии, теории и методики преподавания биологии, естественно-географический факультет, Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского, Ярославль

В микроциркуляторном русле осуществляются процессы диффузии газов и трансапиллярный обмен. В связи с этим актуальной задачей является оценка состояния регуляции кровоснабжения кожи и функциональных возможностей системы микроциркуляции крови на отдельных этапах онтогенеза. С помощью метода лазерной доплеровской флоуметрии в группе мальчиков ($n = 15$) и девочек ($n = 13$) по достижении ими возрастов 8 и 10 лет оценивали состояние кожной микроциркуляции и функционирование механизмов ее регуляции. Обнаружено увеличение показателя микроциркуляции в возрастном периоде от 8 до 10 лет, вызванное перераспределением механизмов регуляции микрокровотока. При сравнении базальных показателей микроциркуляции достоверных половых различий в возрастах 8 и 10 лет не выявлено, однако поддержание примерно равного уровня перфузии у мальчиков и девочек достигается при разном соотношении регуляторных влияний на микрокровоток. При проведении дыхательной пробы выявлено увеличение исходного показателя микроциркуляции и резерва капиллярного кровотока в группе мальчиков и девочек в возрасте 10 лет. В ходе проведенного исследования между детьми 8- и 10-летнего возраста выявлены различия в показателях микроциркуляции, в степени выраженности активных и пассивных ритмов колебаний кровотока и реакции на дыхательную пробу, что свидетельствует о возрастных преобразованиях системы микроциркуляции.

Ключевые слова: лазерная доплеровская флоуметрия, механизмы регуляции микрокровотока, дыхательная функциональная проба, резерв капиллярного кровотока

✉ Для корреспонденции: Наталья Владимировна Бабошина
150000, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108; pankrateva@bk.ru

Статья поступила: 01.06.2016 Статья принята к печати: 12.06.2016

EVALUATION OF MICROCIRCULATION IN CHILDREN OF 8 AND 10 YEARS OF AGE USING INSPIRATORY BREATH HOLD

Baboshina NV ✉

Department of Medicine, Biology and Approaches to Teaching Biology, Faculty of Natural Sciences and Geography, Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia

Gas diffusion and transcapillary exchange take place in the microvasculature. Therefore, the evaluation of skin blood flow regulation and functional capacities of the microcirculatory system at various ontogenesis stages is of great importance. Using laser Doppler flowmetry in the group of boys ($n = 15$) and girls ($n = 13$) of 8 and 10 years of age, skin microcirculation and its regulatory mechanisms were evaluated. The study found an increase in the perfusion index in children between the age of 8 and 10 induced by the shifting roles of mechanisms of the microcirculatory regulation. The comparison of basal microcirculatory parameters did not display statistically significant differences related to sex in 8- and 10-year old participants. However, almost equal perfusion in boys and girls was maintained by different contributions of regulatory mechanisms. The breath holding test showed an increase in the initial microcirculation index and capillary blood flow reserve in the group of 10-year-old boys and girls. Our study revealed differences in various microcirculation parameters, in the intensity of active and passive rhythms of blood flow oscillations and response to inspiratory breath hold, which indicates age-related transformations of microcirculation system.

Keywords: laser Doppler flowmetry, microcirculatory regulation, inspiratory breath hold, capillary flow reserve

✉ Correspondence should be addressed: Natalia Baboshina
ul. Respublikanskaya, d. 108, Yaroslavl, Russia, 150000; pankrateva@bk.ru

Received: 01.06.2016 Accepted: 12.06.2016

Согласно современным представлениям все функции организма претерпевают изменения при тесном взаимодействии организма и среды. В соответствии с этим адаптивный характер функционирования организма в различные возрастные периоды определяется морфофункциональной зрелостью физиологических систем и адекватностью воздействующих средовых факторов функциональным возможностям организма [1].

Состояние сердечно-сосудистой системы, которая является одной из важных систем жизнеобеспечения, часто

рассматривают как индикатор функционального состояния целостного организма [2]. Однако предметом физиологических исследований все чаще становятся процессы функционального взаимодействия кровеносной и дыхательной систем [3].

Такое внимание к взаимодействию названных систем продиктовано тем, что кардиореспираторная система, обеспечивающая поступление кислорода к клеткам организма и в значительной степени обуславливающая состояние гомеостаза, является одной из важнейших физиоло-

гических систем. Она определяет как умственную, так и физическую работоспособность человека и возможности его адаптации к разным видам деятельности [4]. Периферический кровоток, осуществляющийся в сосудах отдельных органов и тканей, направлен на обеспечение адекватного кровоснабжения в них в соответствии с постоянно меняющейся метаболической активностью.

Одной из наиболее актуальных проблем возрастной физиологии является оценка состояния отдельных звеньев и регуляторных механизмов перфузии ткани кровью, определяющих в конечном счете нормальное функционирование органов и организма в целом. Крайне важно также исследование функциональных возможностей системы микроциркуляции крови в ходе онтогенеза [5], позволяющее раскрыть закономерности формирования и особенности функционирования микроциркуляторного русла, проанализировать его феноменологию и структуру, определить функциональный резерв и условия эффективной адаптации системы микроциркуляции на разных этапах развития ребенка [6, 7].

Интерес к микроциркуляции продиктован чрезвычайной важностью процессов, происходящих в регионе терминальных сосудов. Функциональный контакт микроциркуляторного русла с тканями является определяющим фактором, который обеспечивает гомеостаз организма посредством сложной и тонкой регуляции микроциркуляции в соответствии с метаболическими запросами тканей. В силу чего именно конечное сосудистое русло — это область, где прежде всего происходят сдвиги компенсаторно-приспособительного характера, во многом определяющие функциональное состояние организма [8]. В научной литературе представлено значительное количество работ, посвященных исследованию микроциркуляторного русла у детей младшего школьного возраста [7, 9–11]. Так, например, в работе Кутыревой и соавт. были продемонстрированы возрастные отличия в базальных показателях микроциркуляции и механизмах ее регуляции у детей 3–4 и 10–12 лет; установлены изменения функционального резерва микроциркуляции с возрастом.

В последние десятилетия наиболее широко для исследования кровотока применяют методы, основанные на доплерографии сосудистого русла. Одним из основных методов изучения состояния микроциркуляции и ее регуляторных механизмов служит лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) совместно с функциональными пробами [12]. Достоинством ЛДФ является возможность измерения микрокровотока *in vivo* и бесконтактно, что очень важно для тестирования микрогемодинамики в детском возрасте.

Применение функциональной дыхательной пробы (пробы с задержкой дыхания) позволяет получить большой объем информации о характере микрогемодинамики и ее резервных возможностях, а также оценить функциональный вклад различных звеньев модуляции микрокровотока. Величина снижения кровотока при дыхательной вазоконстрикторной пробе отражает как влияние со стороны симпатической иннервации, так и реактивность сосудистой стенки.

Дыхательная проба не только проста в применении, но и высокоинформативна. В участках кожи с высокой плотностью симпатической иннервации она положительна у всех здоровых лиц [13].

Исходя из вышеизложенного, целью работы было исследование микроциркуляции крови у детей 8 и 10 лет с использованием дыхательной пробы.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены практически здоровые дети обоих полов после получения письменного информированного согласия их законных представителей (родителей): группа мальчиков ($n = 15$) и девочек ($n = 13$). Обследование детей проводили дважды с интервалом в два года: в 2013 и 2015 гг. по достижении ими возрастов 8 и 10 лет. Оценку состояния микрогемодициркуляции производили методом лазерной доплеровской флоуметрии с помощью компьютеризированного лазерного анализатора ЛАКК-02 (НПП «ЛАЗМА», Россия).

Кожа представляет собой традиционно доступный в клинической практике объект для функциональной диагностики состояния микроциркуляции [14]. В качестве тестируемой области была выбрана дистальная фаланга второго пальца правой кисти. Эта область относится к гладкой коже, не имеющей волосяного покрова (glabrous skin). Она богата не только исключительно зависимыми от симпатической иннервации артериоловеноулярными анастомозами, но и вегетативными и сенсорными нервными волокнами [13].

Определяли следующие характеристики показателя микроциркуляции: его среднее арифметическое значение M (средняя перфузия), среднее квадратичное отклонение σ (среднее колебание перфузии относительно среднего значения потока крови или средняя модуляция кровотока), коэффициент вариации K_v и амплитудно-частотные характеристики отраженного сигнала.

Среди звеньев регуляции микрокровотока выделяют пассивные и активные механизмы, которые в полосе 0,005–3 Гц формируют пять неперекрывающихся частотных диапазонов: 0,007–0,017 Гц — диапазон эндотелиальной активности; 0,023–0,046 Гц — нейрогенной (симпатической адренергической) активности; 0,05–0,145 Гц — миогенной (гладкомышечной) активности; 0,2–0,4 Гц — диапазон респираторного ритма; 0,8–1,6 Гц — кардиального ритма [15]. Регистрируемый в ЛДФ-грамме колебательный процесс является результатом наложения колебаний, обусловленных функционированием активных и пассивных механизмов. Активные механизмы (эндотелиальный, нейрогенный и миогенный механизмы регуляции просвета сосудов) создают поперечные колебания кровотока в результате чередования сокращения и расслабления мышц сосудов (сменяющие друг друга эпизоды вазоконстрикции и вазодилатации). Пассивные факторы (дыхательные и кардиальные ритмы) организуют продольные колебания кровотока, выражающиеся в периодическом изменении давления и объема крови в сосуде [13].

Амплитудно-частотный спектр колебаний рассчитывали с помощью вейвлет-преобразования и оценивали вклад эндотелиальных, нейрогенных и миогенных компонентов тонуса микрососудов, а также дыхательных и сердечных ритмов [16]. Рассчитывали нейрогенный тонус (НТ) прекапиллярных резистивных микрососудов и миогенный тонус (МТ) метартериол и прекапиллярных сфинктеров, а также показатель шунтирования (ПШ) по формулам:

$$НТ = (\sigma \times P_{cp}) / (A_n \times M),$$

$$МТ = (\sigma \times P_{cp}) / (A_m \times M),$$

$$ПШ = A_n / A_m,$$

где σ — среднее квадратичное отклонение показателя микроциркуляции; P_{cp} — среднее артериальное давление; M — среднее арифметическое значение показателя микроциркуляции; A_n и A_m — максимальные усредненные

амплитуды осцилляций симпатического адренергического и миогенного диапазонов частот [13].

Ввиду разброса результатов измерений амплитуд колебаний осуществлять диагностику работы того или иного механизма регуляции только по величинам амплитуд затруднительно. Поэтому кроме $A_{\max}$ анализировали функциональный вклад каждого звена в модуляцию микрокровотока: $(A_{\max} / 3\sigma) \times 100 \%$, а также вклад в общий уровень тканевой перфузии: $(A_{\max} / M) \times 100 \%$. Данные нормированные параметры рассчитывались в автоматическом режиме после определения значения $A_{\max}$ в соответствующем частотном диапазоне [16, 17].

С целью исследования резервных возможностей микрокровотока использовали дыхательную вазоконстрикторную пробу. Функциональную пробу осуществляли путем 30-секундной задержки дыхания на высоте глубокого вдоха, что приводило к кратковременному снижению показателя микроциркуляции с дальнейшим восстановлением кривой до исходного уровня (рисунок).

При проведении дыхательной пробы регистрировали следующие показатели: $M_{\text{исх}}$ — исходная величина показателя микроциркуляции; $PF_{\text{реакц}}$ — минимальный уровень снижения перфузии при дыхательной пробе; $M_{\text{восст}}$ — значение показателя микроциркуляции после восстановления дыхания; а также интервалы времени: T3–T1 — между началом задержки дыхания и началом спада уровня микрокровотока, T4–T3 — между началом спада уровня микрокровотока и минимальным значением показателя микроциркуляции, T5–T4 — от момента достижения минимального значения показателя микроциркуляции до восстановления дыхания.

По результатам пробы с задержкой дыхания определяли степень снижения показателя микроциркуляции (ΔM) и рассчитывали резерв капиллярного кровотока (РКК, %) по формулам:

$$\Delta M = [(M_{\text{исх}} - M_{\text{мин}}) / M_{\text{исх}}] \times 100 \%,$$

$$\text{РКК} = (M_{\text{мин}} / M_{\text{исх}}) \times 100 \%,$$

где $M_{\text{мин}}$ и $M_{\text{исх}}$ — минимальная и исходная величины показателя микроциркуляции [13].

Полученные данные (в том числе для σ и K_v) представлены в виде средних арифметических значений с их стандартным отклонением. Статистическую обработку полученных данных после проверки выборки на соответствие закону нормального распределения проводили

с использованием параметрического t-критерия Стьюдента с помощью программы Microsoft Excel. Поскольку в экспериментальное исследование состояния микроциркуляции были вовлечены одни и те же школьники с интервалом в два года (измерения выполнены в 2013 и 2015 гг.), для оценки статистической значимости возрастных изменений параметров микроциркуляции использовали парный t-критерий Стьюдента для связанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группах обследуемых лиц с возрастом наблюдали повышение показателя микроциркуляции у мальчиков и девочек на 36,0 и 42,5 % ($p < 0,01$) соответственно. Достоверных изменений в модуляции кровотока (σ) в обеих группах не выявлено. Вариабельность кровотока (K_v) в группе мальчиков достоверно уменьшилась на 30,7 % ($p < 0,01$), у девочек значение K_v достоверно не изменилось.

Расчетные параметры M , σ и K_v дают общую оценку состояния микроциркуляции крови. Более детальный анализ функционирования микроциркуляторного русла проведен на втором этапе при обработке амплитудно-частотного спектра колебаний перфузии.

У мальчиков с возрастом нормированная амплитуда эндотелиальных ритмов уменьшилась на 19,7 % ($p < 0,05$); амплитуда колебаний миогенных осцилляций возросла на 24,4 % ($p < 0,01$). В группе мальчиков 10 лет значения максимальных, нормированных и приведенных амплитуд колебаний во всех диапазонах пассивных факторов регуляции микрокровотока (дыхательных и сердечных ритмов) были достоверно выше по сравнению с данными, полученными в возрасте 8 лет. Значения миогенного тонуса и показателя шунтирования с возрастом снизились на 12,2 % ($p < 0,05$) и 22,5 % ($p < 0,01$) соответственно (табл. 1).

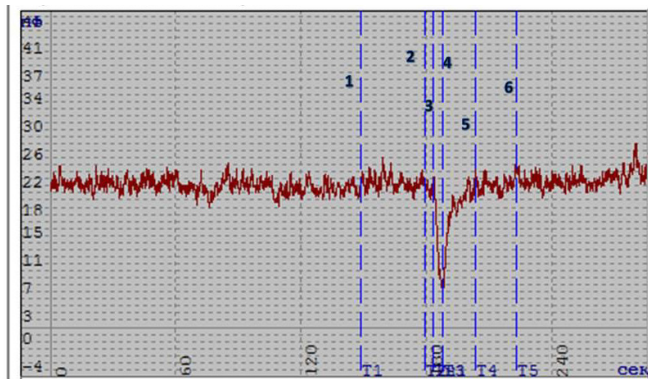
У девочек в период от 8 до 10 лет отмечено снижение функционального вклада в модуляцию микрокровотока эндотелиального ритма и нейрогенных осцилляций на 23,6 и 20,9 % ($p < 0,05$) соответственно. Вклад в общий уровень тканевой перфузии миогенных ритмов был снижен на 29,3 % ($p < 0,05$). Максимальные амплитуды дыхательных и сердечных ритмов увеличились с возрастом на 84,2 % ($p < 0,001$) и 38,9 % ($p < 0,05$). Значение нейрогенного тонуса возросло на 31,4 % ($p < 0,05$), показателя шунтирования снизилось на 15,2 % ($p < 0,05$) (табл. 1).

Базальные показатели микроциркуляции достоверно не различались у мальчиков и девочек в возрастах 8 и 10 лет. У девочек 8 лет вклад нормированных амплитуд дыхательных и сердечных ритмов выше, чем у мальчиков их возраста, на 17,6 и 36,6 % ($p < 0,05$) соответственно. У 10-летних мальчиков, в сравнении с данными девочек того же возраста, нормированная амплитуда миогенных ритмов выше на 27,5 % ($p < 0,01$), а нейрогенный тонус снижен на 18 % ($p < 0,05$).

Анализ результатов дыхательной пробы показал, что более высокий исходный уровень перфузии зафиксирован в группе мальчиков и девочек в возрасте 10 лет: у мальчиков выше на 36,0 %, у девочек — на 42,5 % по сравнению с аналогичными данными, полученными у них в возрасте 8 лет ($p < 0,01$) (табл. 2).

Интервал между началом задержки дыхания и началом спада уровня микрокровотока у мальчиков за два года уменьшился на 18,3 %, у девочек он вырос на 23,3 % ($p < 0,05$). С возрастом у мальчиков и девочек зафиксиро-

Функциональные пробы



Пример ЛДФ-граммы при 30-секундной задержке дыхания у ребенка 8 лет. Цифрами на рисунке обозначены: 1 — исходная величина показателя микроциркуляции; 2 — начало задержки дыхания; 3 — начало спада показателя микроциркуляции; 4 — минимальное значение показателя микроциркуляции; 5 — окончание задержки дыхания; 6 — значение показателя микроциркуляции после восстановления дыхания.

Таблица 1. Показатели микроциркуляции и механизмов ее регуляции у детей в возрасте от 8 до 10 лет

Показатель		Мальчики (n = 15)		Девочки (n = 13)	
		8,13 ± 0,34 года	10,00 ± 0,33 года	8,00 ± 0,33 года	10,00 ± 0,33 года
Показатель микроциркуляции	M, пф. ед.	19,65 ± 5,34	26,77 ± 6,00**	20,23 ± 4,03	28,89 ± 6,23**
	σ , пф. ед.	2,29 ± 0,85	2,22 ± 0,66	2,42 ± 0,92	2,70 ± 1,01
	K _v , %	13,09 ± 4,91	9,07 ± 3,11**	12,22 ± 4,45	10,43 ± 4,65
Эндотелиальные ритмы	A _{max} , пф. ед.	1,58 ± 0,83	1,28 ± 0,87	1,29 ± 0,45	1,40 ± 0,63
	(A _{max} / 3 σ) × 100 %	20,84 ± 5,17	16,72 ± 5,23*	21,16 ± 4,77	16,16 ± 2,87*
	(A _{max} / M) × 100 %	8,23 ± 3,87	4,82 ± 2,88*	7,12 ± 2,68	5,35 ± 2,67
Нейрогенные ритмы	A _{max} , пф. ед.	1,36 ± 0,49	1,35 ± 0,67	1,51 ± 0,68	1,43 ± 0,71
	(A _{max} / 3 σ) × 100 %	18,02 ± 3,19	18,33 ± 3,90	20,52 ± 4,28	16,15 ± 4,65*
	(A _{max} / M) × 100 %	7,16 ± 2,67	5,13 ± 2,44*	7,53 ± 3,28	5,02 ± 2,49*
Миогенные ритмы	A _{max} , пф. ед.	1,00 ± 0,35	1,12 ± 0,41	1,09 ± 0,42	1,19 ± 0,49
	(A _{max} / 3 σ) × 100 %	13,49 ± 2,92	16,84 ± 3,82**	15,26 ± 3,52	13,21 ± 3,38
	(A _{max} / M) × 100 %	5,19 ± 1,36	4,25 ± 1,47	5,49 ± 2,07	3,88 ± 1,45*
Дыхательные ритмы	A _{max} , пф. ед.	0,31 ± 0,10	0,58 ± 0,19***	0,33 ± 0,11	0,61 ± 0,18***
	(A _{max} / 3 σ) × 100 %	4,34 ± 1,08	8,41 ± 2,49***	5,28 ± 0,95	7,55 ± 2,48*
	(A _{max} / M) × 100 %	1,52 ± 0,36	2,16 ± 0,54**	1,79 ± 0,67	2,14 ± 0,68
Сердечные ритмы	A _{max} , пф. ед.	0,18 ± 0,04	0,35 ± 0,11***	0,28 ± 0,11	0,39 ± 0,14*
	(A _{max} / 3 σ) × 100 %	2,67 ± 1,02	5,28 ± 2,11**	4,21 ± 2,16	5,08 ± 1,52
	(A _{max} / M) × 100 %	0,99 ± 0,24	1,32 ± 0,34**	1,33 ± 0,81	1,47 ± 0,52
НТ, отн. ед.		1,84 ± 0,38	1,82 ± 0,32	1,69 ± 0,38	2,22 ± 0,62*
МТ, отн. ед.		2,37 ± 0,48	2,08 ± 0,51*	2,29 ± 0,51	2,41 ± 0,61
ПШ, отн. ед.		1,38 ± 0,36	1,07 ± 0,15**	1,38 ± 0,32	1,17 ± 0,20*

Примечание: Здесь и в табл. 2 данные представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. M — среднее значение показателя микроциркуляции; σ — среднее квадратичное отклонение колебаний перфузии или средняя модуляция кровотока; K_v — коэффициент вариации показателя микроциркуляции или вариабельность кровотока; НТ — нейрогенный тонус; МТ — миогенный тонус; ПШ — показатель шунтирования; A_{max}, (A_{max} / 3 σ) × 100 % и (A_{max} / M) × 100 % — максимальная, нормированная и приведенная амплитуды.

* — p < 0,05; ** — p < 0,01; *** — p < 0,001 при сравнении с соответствующими показателями более раннего возраста.

Таблица 2. Показатели микроциркуляции при дыхательной пробе у детей в возрасте от 8 до 10 лет

Показатель	Мальчики (n = 15)		Девочки (n = 13)	
	8,13 ± 0,34 года	10,00 ± 0,33 года	8,00 ± 0,33 года	10,00 ± 0,33 года
M _{иск} , пф. ед.	20,26 ± 5,49	26,91 ± 6,49**	19,73 ± 5,91	29,54 ± 6,36**
ПФ _{реакц} , пф. ед.	10,12 ± 4,06	16,17 ± 7,90*	9,38 ± 2,58	18,68 ± 7,69**
M _{восст} , пф. ед.	18,87 ± 4,40	26,90 ± 6,65**	19,93 ± 5,22	29,68 ± 6,94**
T3–T1, с	11,28 ± 3,95	9,23 ± 2,28*	10,34 ± 1,66	12,76 ± 3,03*
T4–T3, с	8,01 ± 4,10	4,74 ± 1,88*	9,65 ± 4,22	6,58 ± 2,45*
T5–T4, с	10,64 ± 4,64	17,81 ± 6,75**	9,35 ± 3,06	22,02 ± 6,00***
РКК, %	54,09 ± 17,81	59,57 ± 24,35	50,88 ± 13,32	66,78 ± 16,48**
Δ M, %	50,20 ± 26,10	39,70 ± 23,10*	52,40 ± 22,50	36,96 ± 20,77**

Примечание: M_{иск} — исходное значение показателя микроциркуляции перед задержкой дыхания; ПФ_{реакц} — минимальное значение перфузии при дыхательной пробе; M_{восст} — значение показателя микроциркуляции после восстановления дыхания; T3–T1 — интервал времени между началом задержки дыхания и началом спада уровня микрокровотока; T4–T3 — интервал времени между началом спада уровня микрокровотока и минимальным значением показателя микроциркуляции; T5–T4 — интервал времени от момента достижения минимального значения показателя микроциркуляции до восстановления дыхания; РКК — резерв капиллярного кровотока; Δ M — степень снижения показателя микроциркуляции.

* — p < 0,05; ** — p < 0,01; *** — p < 0,001 при сравнении с соответствующими показателями более раннего возраста.

ровано увеличение времени от момента достижения минимального значения показателя микроциркуляции до восстановления дыхания на 67,9 % (p < 0,01) и 135,0 % (p < 0,001) соответственно.

Резервный кровоток в микрососудах у мальчиков достоверно не изменился, однако наблюдалась тенденция к его увеличению; у девочек РКК увеличился на 31,5 % (p < 0,01).

У девочек в 10 лет нейрогенный тонус был выше на 31,4 % (p < 0,05) и значение Δ M ниже на 30,2 % (p < 0,01) по сравнению с данными, полученными у них в возрасте 8 лет. У 10-летних мальчиков нейрогенный тонус достоверно не изменился, относительная величина снижения показателя микроциркуляции при вазоконстрикторной пробе уменьшилась на 20,9 % (p < 0,05).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что развитие организма протекает неравномерно: продолжительные устойчивые периоды развития сменяются сравнительно короткими неустойчивыми, «критическими». Именно в эти «критические» периоды развития происходит усиленное формирование новых качественных свойств и отдельных физиологических систем, что сопряжено с активацией энергетического обмена [18].

Опубликованные данные показывают, что формирование механизмов регуляции микроциркуляции приходится на 6 лет, а окончательное становление особенностей функционирования системы микроциркуляции связано с периодом полового созревания, по завершении которого формируется дефинитивный тип микроциркуляции крови [19].

Литвин в своей работе отмечает, что с возрастом наблюдается тенденция к повышению уровня перфузии тканей кровью [1].

В нашем исследовании зафиксирован выраженный рост перфузии в интервале от 8 до 10 лет, обусловленный, по всей видимости, возрастными преобразованиями системы микроциркуляции, что является результатом повышения интенсивности метаболических процессов. Увеличение амплитуды пульсовой волны на фоне повышенной величины показателя микроциркуляции свидетельствует об увеличении притока в микроциркуляторное русло артериальной крови [16].

Снижение показателя шунтирования у обследуемых указывает на уменьшение мышечного тонуса прекапилляров, регулирующих приток крови в обменное (нутритивное) русло. Однако у мальчиков это достигается уменьшением миогенного тонуса, тогда как у девочек — повышением нейrogenного тонуса, что свидетельствует об увеличении объема крови, поступающей в нутритивное звено.

При сравнении базальных показателей микроциркуляции не выявлено достоверных различий между уровнем перфузии у мальчиков и девочек в возрастах 8 и 10 лет, однако поддержание примерно равного уровня перфузии в возрасте 10 лет у мальчиков и девочек достигалось при разном соотношении регуляторных влияний и параметров микрососудистого тонуса на микрокровоток.

В микроциркуляторное русло кожи дыхательные осцилляции проникают со стороны веноулярного звена и в основном регистрируются в венах. Формирование указанных колебаний в системе микроциркуляции кожи человека обусловлено по меньшей мере двумя механизмами: во-первых, механической трансмиссией респираторной динамики внутригрудного давления, опосредуемой венозной системой (присасывающее действие грудной клетки с ростом кровенаполнения вен на вдохе), а во-вторых, центральным вегетативным взаимодействием сердечно-сосудистого и дыхательных центров. В первом случае указанный механизм носит пассивный гидростатический характер, т. е. респираторнозависимые колебания реализуются за счет распространения волны давления, не затрагивая собственных активных механизмов регуляции сосудистого тонуса. Во втором случае представленные осцилляции кровотока формируют активные вазоконстрикторные механизмы нейrogenной природы, одним из которых является известный инспираторный вазомоторный рефлекс, который проявляется в кратковременном снижении перфузии ткани кровью в ответ на резкий глубокий вдох. Инспираторный вазомоторный рефлекс реализуется через симпатическую периферическую иннервацию [20].

Вазомоторный рефлекс, запускаемый быстрым и глубоким вдохом, вызывает констрикцию артериол и кратковременное уменьшение кожного кровотока. Снижение перфузии при дыхательной пробе отражает симпатическую регуляцию, ограниченную преимущественно нейрососудистым синапсом [13].

В исследовании Литвина [21] было показано, что с возрастом (от 7 до 20 лет) отмечается увеличение функциональных резервов системы микроциркуляции. В нашем исследовании в результате применения дыхательной функциональной пробы выявлены увеличение резервных возможностей микрокровотока при кратковременной гипоксии в группе девочек и выраженная тенденция к увеличению РКК в группе мальчиков.

Реакция сосуда на активацию адренергических волокон зависит как от влияний со стороны симпатической иннервации, так и от реактивности сосудистой стенки. Поэтому величина снижения кровотока при дыхательной пробе отражает результирующую этих двух процессов, которые трудно оценить изолированно. В связи с этим трактовку результатов ЛДФ для оценки функции симпатической периваскулярной иннервации целесообразно осуществлять по двум параметрам — исходному нейrogenному тону в покое и относительной величине снижения показателя микроциркуляции при дыхательной пробе [13]. Выявленные изменения НТ и ΔM у девочек 10 лет позволяют сделать заключение о повышении симпатической активности при стимуляции вазоконстрикторными пробами, тогда как у мальчиков 10 лет изменение величины снижения кровотока вызвано уменьшением реактивности преганглионарных нейронов при функциональной нагрузке [16].

Степень снижения показателя микроциркуляции при дыхательной пробе отражает симпатическую регуляцию, ограниченную преимущественно нейрососудистым синапсом. Следовательно, выявленное с возрастом снижение параметра ΔM в группе мальчиков и девочек свидетельствует о менее выраженной реакции сосудистой стенки на задержку дыхания. С возрастом проявляется тенденция к менее выраженной реакции уменьшения перфузии при проведении дыхательной пробы.

С физиологических позиций изучение периода от 8 до 10 лет является актуальным, поскольку именно этот возраст находится между двумя критическими периодами: полуростовым и пубертатным. Первый период приходится обычно на возраст 5–6 лет и связан с существенными морфофункциональными перестройками преимущественно в нервной системе [22]. Пубертатный критический период связан с началом полового созревания и перестройкой гормональной и мышечной систем.

У детей в возрасте от 8 до 10 лет интенсивность окислительных процессов остается весьма высокой, несмотря на то, что обменные процессы в этом возрасте достаточно стабильны. Однако наблюдается расширение резервных возможностей большинства физиологических систем, в том числе кардиореспираторной. Повышенная потребность органов и тканей детского организма в кислороде обуславливает своеобразную организацию функционирования сердечно-сосудистой и дыхательной систем. Хотя экономичность работы кровообращения и дыхания в младшем возрасте еще не так велика как у взрослых, степень их согласованности значительна [22]. Тесная функциональная взаимосвязь дыхательной и сердечно-сосудистой систем предполагает и их взаимозависимость. Изменения в функционировании дыхательной системы неизбежно приводят к адаптивным перестройкам в системе

кровообращения и кислородном питании тканей.

Развитие кардиореспираторной системы в онтогенезе происходит гетерохронно в тесной взаимосвязи с физическим развитием организма детей, морфологической перестройкой легких, сердца, грудной клетки, возрастной динамикой метаболических процессов и совершенствованием регуляторных механизмов. В связи с этим кардиореспираторная система ребенка школьного возраста в различные возрастные периоды имеет не только количественные, но и качественные различия. В их основе лежат процессы непрерывного развития морфологических структур и функциональных перестроек [23].

ВЫВОДЫ

В ходе проведенного исследования выявлены изменения периферического кровотока, характеризующиеся увеличением перфузии тканей кровью с возрастом в группе мальчиков и девочек. Это, по всей видимости, обусловлено перераспределением влияния механизмов регуляции, а именно снижением вклада амплитуд колебаний активных звеньев модуляции и повышением вклада пассивных звеньев модуляции микрогемодинамики. Значительный рост пульсовой волны свидетельствует об увеличении притока артериальной крови в микроциркуляторное русло. Увели-

чение амплитуды дыхательной волны, обусловленное венозным давлением, указывает на снижение микроциркуляторного давления.

В результате исследования установлено, что в возрасте 8 и 10 лет базальные показатели микроциркуляции мальчиков и девочек достоверно не отличались. Однако поддержание примерно равного уровня перфузии достигалось благодаря разному соотношению влияния активных и пассивных факторов контроля микроциркуляторного русла.

При оценке резервных возможностей микроциркуляции с помощью дыхательной пробы отмечено, что совершенствование вегетативной регуляции микрокровотока в период от 8 до 10 лет выражалось в снижении реактивности сосудистой стенки микрососудов в ответ на симпатические адренергические стимулы.

Необходимы дальнейшие исследования, которые будут направлены на изучение микроциркуляторного русла и его регуляторных механизмов на разных этапах онтогенеза, в том числе при переходе к периоду полового созревания, когда начинают формироваться половые отличия в функционировании гемомикроциркуляции. Эти исследования позволят составить более полное представление о динамике состояния микроциркуляции человека и выявить возрастные особенности периферического кровообращения.

Литература

1. Литвин Ф. Б. Особенности становления системы микроциркуляции в онтогенезе у детей и подростков из радиоэкологически неблагоприятных регионов. Нов. исслед. 2009; 1 (20): 38–44.
2. Литвин Ф. Б., Аносов И. П., Асямоллов П. О., Васильева Г. В., Мартынов С. В., Жигало В. Я. Сердечный ритм и система микроциркуляции у лыжников в предсоревновательном периоде спортивной подготовки. Вестн. УдГУ. Сер. Биол. 2012; 1: 67–74.
3. Кирилина Т. В., Красников Г. В., Танканаг А. В., Пискунова Г. М., Чемерис Н. К. Респираторнозависимые колебания кровотока в системе микроциркуляции кожи человека. Регионар. кровообращ. и микроциркул. 2009; 2 (30): 58–62.
4. Токаева Л. К., Павленкович С. С. Физическая работоспособность как интегральный показатель функционального состояния и физического здоровья студентов педагогического вуза. Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. 2011; (25): 645–9.
5. Чуян Е. Н., Горная О. И. Особенности микроциркуляции крови у юношей-студентов. Уч. зап. ТНУ. Сер. Биол., хим. 2009; 2: 166–74.
6. Грибанов А. В. Кровообращение и дыхание у школьников в циркулярных условиях. Архангельск: САФУ; 2016. 270 с.
7. Кутырева О. И., Дьяконова Е. Н., Лобанова Л. В. Возрастные особенности микроциркуляции у здоровых детей. Вестн. нов. мед. технол. 2009; 16 (3): 37–8.
8. Васильев А. П., Стрельцова Н. Н., Секисова М. А., Зыкова Е. Л. Функциональные особенности и клинико-прогностическое значение различных гемодинамических типов микроциркуляции у больных артериальной гипертензией. Кардиология. 2008; 9 (49): 90–5.
9. Гурова О. А., Козлов В. И. Особенности микроциркуляции крови в коже у детей. Вестн. РУДН. Сер. Мед. 2011; 1: 12–6.
10. Дьяконова Е. Н. Особенности микроциркуляции крови у мальчиков в возрасте от 9 до 12 лет в зависимости от интенсивности и продолжительности занятий спортом. Вестн. нов. мед. технол. 2009; 2: 54–6.
11. Гурова О. А. Изменения кожного кровотока при умеренной физической нагрузке у детей 4–7 лет с разным типом микроциркуляции крови. Нов. исслед. 2010; 4 (25): 30–5.
12. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. Microcirculation. 2012 Jan; 19 (1): 47–64.
13. Крупаткин А. И., Сидоров В. В. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови. М.: Медицина; 2005. 123 с.
14. Козлов В. И., Морозов М. В., Гурова О. А. ЛДФ-метрия кожного кровотока в различных областях тела. Регионар. кровообращ. и микроциркул. 2012; 1 (41): 58–61.
15. Jan YK, Brienza DM, Geyer MJ, Karg P. Wavelet-based spectrum analysis of sacral skin blood flow response to alternating pressure. Arch Phys Med Rehabil. 2008 Jan; 89 (1): 137–45.
16. Крупаткин А. И., Сидоров В. В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем. Колебания, информация, нелинейность. Руководство для врачей. М.: Либроком; 2014. 498 с.
17. Федорович А. А. Функциональное состояние регуляторных механизмов микроциркуляторного кровотока в норме и при артериальной гипертензии по данным лазерной доплеровской флоуметрии. Регионар. кровообращ. и микроциркул. 2010; 1 (33): 49–60.
18. Сонькин В. Д., Тамбовцева Р. В. Развитие мышечной энергетики и работоспособности в онтогенезе. М.: Либроком; 2011. 368 с.
19. Гурова О. А. Индивидуально-типологические особенности микроциркуляции крови у детей 4–7 лет. Нов. исслед. 2014; 2 (39): 15–23.
20. Тюрина М. И., Красников Г. В., Танканаг А. В., Пискунова Г. М., Чемерис Н. К. Формирование респираторнозависимых колебаний скорости кровотока в микроциркуляторном русле кожи человека в условиях контролируемого дыхания. Регионар. кровообращ. и микроциркул. 2011; 3 (39): 31–7.
21. Литвин Ф. Б. Возрастные и индивидуально-типологические особенности микроциркуляции у мальчиков, подростков и юношей. Регионар. кровообращ. и микроциркул. 2006; 1 (17): 44–50.
22. Безруких М. М., Фарбер Д. А. Актуальные проблемы физиологии развития ребенка. Нов. исслед. 2014; 3 (40): 4–19.
23. Ослякова А. О. Функционирование регуляторных механизмов периферического кровотока в норме и при нарушениях деятельности кардиореспираторной системы [диссертация]. Ярославль: ЯГПУ им. К. Д. Ушинского; 2013.

References

1. Litvin FB. Osobennosti stanovleniya sistemy mikrocirkulyatsii v ontogeneze u detei i podrostkov iz radioekologicheskikh neblagopoluchnykh regionov. Novye issledovaniya. 2009; 1 (20): 38–44. Russian.
2. Litvin FB, Anosov IP, Asyamolov PO, Vasil'eva GV, Martynov SV, Zhigalo VYa. Serdechnyi ritm i sistema mikrotsirkulyatsii u lyzhnikov v pedsorevnovatel'nom periode sportivnoy podgotovki. Bulletin of Udmurt University. Biology. 2012; 1: 67–74. Russian.
3. Kirilina TV, Krasnikov GV, Tankanag AV, Piskunova GM, Chemeris NK. Respiratornozavisimye kolebaniya krovotoka v sisteme mikrotsirkulyatsii kozhi cheloveka. Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya. 2009; 2 (30): 58–62. Russian.
4. Tokaeva LK, Pavlenkovich SS. Fizicheskaya rabotosposobnost' kak integral'nyi pokazatel' funktsional'nogo sostoyaniya i fizicheskogo zdorov'ya studentov pedagogicheskogo vuza. Izvestiya PGPU im. V. G. Belinskogo. 2011; (25): 645–9. Russian.
5. Chuyan EN, Gornaya OL. Osobennosti mikrotsirkulyatsii krovi u yunoshei-studentov. Scientific notes of TNU. Series Biology and Chemistry. 2009; 2: 166–74.
6. Gribanov AV. Krovoobrashchenie i dykhanie u shkol'nikov v tsirkumpolyarnykh usloviyakh. Arkhangelsk: SAFU; 2016. 270 p. Russian.
7. Kutyreva OL, D'yakonova EN, Lobanova LV. Vozrastnye osobennosti mikrotsirkulyatsii u zdorovykh detei. Journal of New Medical Technologies. 2009; 16 (3): 37–8. Russian.
8. Vasil'ev AP, Strel'tsova NN, Sekisova MA, Zyкова EL. Funktsional'nye osobennosti i kliniko-prognosticheskoe znachenie razlichnykh gemodinamicheskikh tipov mikrotsirkulyatsii u bol'nykh arterial'noi gipertoniei. Kardiologiya. 2008; 9 (49): 90–5. Russian.
9. Gurova OA, Kozlov VI. Osobennosti mikrotsirkulyatsii krovi v kozhe u detei. Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series Medicine. 2011; 1: 12–6. Russian.
10. D'yakonova EN. Osobennosti mikrotsirkulyatsii krovi u mal'chikov v vozraste ot 9 do 12 let v zavisimosti ot intensivnosti i prodolzhitel'nosti zanyatii sportom. Journal of New Medical Technologies. 2009; 2: 54–6. Russian.
11. Gurova OA. Izmeneniya kozhnogo krovotoka pri umerennoi fizicheskoi nagruzke u detei 4–7 let s raznym tipom mikrotsirkulyatsii krovi. Novye issledovaniya. 2010; 4 (25): 30–5. Russian.
12. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. Microcirculation. 2012 Jan; 19 (1): 47–64.
13. Krupatkin AI, Sidorov VV. Lazernaya dopplerovskaya floumetriya mikrotsirkulyatsii krovi. Moscow: Izdatelstvo Meditsina; 2005. 123 p. Russian.
14. Kozlov VI, Morozov MV, Gurova OA. LDF-metriya kozhnogo krovotoka v razlichnykh oblastiakh tela. Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya. 2012; 1 (41): 58–61. Russian.
15. Jan YK, Brienza DM, Geyer MJ, Karg P. Wavelet-based spectrum analysis of sacral skin blood flow response to alternating pressure. Arch Phys Med Rehabil. 2008 Jan; 89 (1): 137–45.
16. Krupatkin AI, Sidorov VV. Funktsional'naya diagnostika sostoyaniya mikrotsirkulyatorno-tkaneykh system. Kolebaniya, informatsiya, nelineinost'. Rukovodstvo dlya vrachei. Moscow: Librocom; 2014. 498 p. Russian.
17. Fedorovich AA. Funktsional'noe sostoyanie regulatorynykh mekhanizmov mikrotsirkulyatornogo krovotoka v norme i pri arterial'noi gipertenzii po dannym lazernoi dopplerovskoi floumetrii. Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya. 2010; 1 (33): 49–60. Russian.
18. Son'kin VD, Tambovtseva RV. Razvitie myshechnoi energetiki i rabotosposobnosti v ontogeneze. Moscow: Librocom; 2011. 368 p. Russian.
19. Gurova OA. Individual'no-tipologicheskie osobennosti mikrotsirkulyatsii krovi u detei 4–7 let. Novye issledovaniya. 2014; 2 (39): 15–23. Russian.
20. Tyurina MI, Krasnikov GV, Tankanag AV, Piskunova GM, Chemeris NK. Formirovanie respiratornozavisimykh kolebaniy skorosti krovotoka v mikrotsirkulyatornom rusle kozhi cheloveka v usloviyakh kontroliruемого dykhaniya. Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya. 2011; 3 (39): 31–7. Russian.
21. Litvin FB. Vozrastnye i individual'no-tipologicheskie osobennosti mikrotsirkulyatsii u mal'chikov, podrostkov i yunoshei. Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya. 2006; 1 (17): 44–50. Russian.
22. Bezrukikh MM, Farber DA. Aktual'nye problemy fiziologii razvitiya rebenka. Novye issledovaniya. 2014; 3 (40): 4–19. Russian.
23. Oslaykova AO. Funktsionirovanie regulatorynykh mekhanizmov perifericheskogo krovotoka v norme i pri narusheniyakh deyatel'nosti kardiorespiratornoi sistemy [dissertation]. Yaroslavl: YSPU; 2013. Russian.

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ОРГАНИЗАЦИИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА НА ФИЗИЧЕСКОЕ РАЗВИТИЕ ШКОЛЬНИКОВ Г. МОСКВЫ

Н. А. Бокарева [✉], О. Ю. Милушкина, З. А. Овчинникова, Ю. П. Пивоваров, Н. И. Шеина

Кафедра гигиены, педиатрический факультет,

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

На здоровье и физическое развитие современных школьников влияют различные факторы, в том числе организация образовательного процесса. В статье представлены данные об особенностях физического развития 1585 подростков в возрасте 15–17 лет из 35 школ г. Москвы: общеобразовательных школ, школ с углубленным изучением отдельных предметов, школ с медико-биологическими классами, школ здоровья. Изучали основные антропометрические показатели — длину и массу тела, а также психоэмоциональный статус по шкале явной тревожности для детей (The Children's Form of Manifest Anxiety Scale) и образ жизни с помощью анкетирования. За контрольную приняли группу подростков из общеобразовательных школ. Исследование показало, что среди учащихся школ здоровья статистически значимо больше подростков с нормальным физическим развитием и меньше — с избытком массы тела, чем среди учащихся группы сравнения ($p < 0,05$), в то время как для других групп результаты были статистически незначимы. Были установлены статистически значимые корреляционные связи между гармоничностью физического развития и несколькими факторами влияния: дефицитом ночного сна ($r = -0,44$, $p < 0,05$), продолжительностью работы за компьютером ($r = -0,44$, $p < 0,05$), психологическим микроклиматом в семье ($r = -0,20$, $p < 0,05$), кратностью приема пищи (коэффициент сопряженности Пирсона — $0,41$, $p < 0,01$, коэффициент сопряженности Крамера — $0,32$, $p < 0,03$).

Ключевые слова: физическое развитие школьников, организация образовательного процесса, школы здоровья, медико-биологические классы, технические средства обучения, двигательная активность

✉ Для корреспонденции: Бокарева Наталья Андреевна
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; nabokareva@mail.ru

Статья поступила: 23.05.2016 Статья принята к печати: 12.06.2016

IMPACT OF LEARNING ENVIRONMENTS ON THE PHYSICAL DEVELOPMENT OF MOSCOW SCHOOLCHILDREN: HYGIENE ASPECTS

Bokareva NA [✉], Milushkina OYu, Ovchinnikova ZA, Pivovarov YuP, Sheina NI

Department of Hygiene, Faculty of Pediatrics,

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Physical development and health of today's schoolchildren are influenced by various factors, including the way the learning process is organized. This article presents data on some aspects of physical development of 1585 teenagers (15 to 17 years old) from 35 Moscow schools, including general education schools, specialized schools, schools with optional advanced courses in biomedical sciences, and health promoting schools. We studied basic anthropometric characteristics of the participants (body height and weight), assessed their psychoemotional status using the Children's Form of Manifest Anxiety Scale and their lifestyle using questionnaire surveys. The control group included teenagers from general education schools. The study showed that the number of teenagers with no abnormalities in their physical development was significantly higher in health promoting school while the number of overweight students there was significantly lower, compared to the controls ($p < 0.05$). For other groups of participants, the results were statistically insignificant. We established statistically significant correlations between well-proportioned physical development and the impacts of night sleep deficit ($r = -0.44$, $p < 0.05$), time spent working on the computer ($r = -0.44$, $p < 0.05$), psychological climate in the family ($r = -0.20$, $p < 0.05$), and meal frequency (Pearson's contingency coefficient was 0.41 , with $p < 0.01$, Cramer's contingency coefficient was 0.32 , with $p < 0.03$).

Keywords: physical development of schoolchildren, learning environment, health promoting schools, advanced courses in biomedical sciences, classroom AV equipment, physical activity

✉ Correspondence should be addressed: Natalia Bokareva
ul. Ostrovityanova, d.1, Moscow, Russia, 117997; nabokareva@mail.ru

Received: 23.05.2016 Accepted: 12.06.2016

Изучение особенностей физического развития детей и подростков не теряет своей актуальности со временем, так как влияющие на него факторы и сила их воздействия меняются. В литературе сообщается об увеличении тотальных размеров тела современных молодых россиян в сравнении со сверстниками предыдущих поколений, ускорении процессов биологического созревания, более ранних сроках менархе, увеличении толщины подкожно-

жировых складок и индекса массы тела, а также о снижении функциональных возможностей организма [1–9].

Важным фактором, влияющим на здоровье и физическое развитие современных школьников, является организация образовательного процесса [10]. Требования к качеству знаний выросли, а вместе с ними — учебная нагрузка, особенно в школах с углубленным изучением отдельных предметов и школах с профильным обучением.

Организация учебного процесса характеризуется вариативностью, направленной на повышение уровня базовых школьных знаний, на формирование профессиональной ориентации и мотивации осознанного выбора будущей профессии, на последующую адаптацию к условиям обучения в вузе. Некоторыми исследователями показано, что образовательные инновации в школе реализуются на фоне ухудшения здоровья детей и подростков (распространение функциональных отклонений и хронических заболеваний) [11–13].

Целью исследования являлось изучение влияния новых форм организации образовательного процесса на физическое развитие современных московских школьников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были обобщены и проанализированы данные, собранные в ходе трех научных экспериментов в течение 2011–2015 гг. [14–16].

Была дана характеристика условий обучения и воспитания в 35 школах г. Москвы, среди которых были общеобразовательные школы, школы с углубленным изучением отдельных предметов, школы с медико-биологическими классами и школы здоровья. Оценивали санитарно-гигиенические условия, техническое оснащение, организацию медицинского обслуживания, питания и образовательного процесса в соответствии с рекомендациями, изложенными в методическом пособии «Комплексная оценка воспитания и обучения детей и подростков в образовательном учреждении» [17]. В исследование были вовлечены 1585 школьников в возрасте 15–17 лет (732 мальчика и 853 девочки). Распределение детей по группам в зависимости от типа школы представлено в табл. 1. В качестве контрольной приняли группу подростков, посещавших общеобразовательные школы.

Физическое развитие школьников оценивали по унифицированной антропометрической методике с использованием стандартного инструментария [18]. Изучали основные антропометрические показатели физического развития — массу и длину тела. Оценку гармоничности физического развития проводили с использованием региональных модифицированных шкал регрессии массы тела по длине тела [19]. Психозомоциональный статус подростков оценивали по шкале явной тревожности для детей (The Children's Form of Manifest Anxiety Scale — CMAS) в адаптации А. М. Прихожан [20, 21]. Для выявления факторов риска развития отклонений в состоянии здоровья и характеристики образа жизни проводили анкетирование школьников и их родителей с помощью стандартных опросников [20].

Таблица 1. Распределение школьников, принявших участие в исследовании, по группам в зависимости от типа школы

Тип образовательного учреждения	Количество учреждений	Количество учащихся	
		мальчики	девочки
Общеобразовательные школы	5	152	135
Школы с углубленным изучением отдельных предметов	5	185	204
Медико-биологические классы	23	347	476
Школы здоровья	2	48	38

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для определения достоверности различий рассчитывали t-критерий Стьюдента, а для оценки влияния изученных факторов на гармоничность физического развития — коэффициенты корреляции и сопряженности.

Исследование было одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н. И. Пирогова (Протокол № 130 от 09 декабря 2013 года). Руководители и родительские комитеты школ дали согласие на участие подростков в эксперименте.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Условия обучения и воспитания современных московских школьников в целом благоприятные: 83,3 % образовательных учреждений были отнесены к первой группе санитарно-эпидемиологического благополучия, а оставшиеся 16,7 % — ко второй.

Наиболее частыми нарушениями санитарно-гигиенических требований были удаленность школы от транспортных магистралей на расстояние менее положенного, небольшая площадь школьных участков и недостаточное их озеленение, несоответствие спортивных площадок санитарным нормам. Отмечались необходимость проведения текущего ремонта, нехватка помещений медицинского блока и недостаточный их размер. Оценка естественного и искусственного освещения позволила выявить некачественное мытье стекол и осветительной арматуры, несвоевременную замену перегоревших ламп и наличие неисправных светильников. Кроме того, в некоторых школах фиксировали несоблюдение воздушного-теплового режима, неправильную расстановку технического средств обучения, несоответствие мебели росту детей.

Недельная учебная нагрузка практически во всех школах отвечала установленным требованиям [22], и только в школах с медико-биологическими классами она превышала допустимые значения на 2,1–2,4 ч и не соответствовала физиологической кривой недельной работоспособности для старшеклассников.

Сравнительный анализ физического развития школьников показал, что среди учащихся школ здоровья статистически значимо больше подростков с нормальным физическим развитием и меньше — с избытком массы тела, чем среди учащихся общеобразовательных школ ($p < 0,05$) (табл. 2). В школах с медико-биологическими классами число детей с нормальным физическим развитием и дефицитом массы тела сопоставимо с таковым в контрольной группе, а число детей с избытком массы тела в 1,3 раза меньше. В школах с углубленным изучением отдельных предметов — наименьшее число учащихся с нормальным физическим развитием. Избыток массы тела в этой группе наблюдается в 1,4 раза реже, а дефицит массы тела — в 1,4 чаще, чем в контрольной. Однако эти наблюдения статистически незначимы.

Усложнение учебного материала, увеличение объема получаемой информации ведут к увеличению объема домашнего задания. Вместе с тем старшеклассники (84,6 % девочек и 71,6 % мальчиков) тратят на его выполнение в среднем 2 ч в день. Значимых межгрупповых различий по этому показателю мы не выявили.

Результаты анкетирования во всех группах оказались схожи, поэтому далее приведены обобщенные данные.

Таблица 2. Физическое развитие московских школьников 15–17 лет с учетом принадлежности к школам с различными типами обучения

Тип образовательного учреждения	Доля подростков с нормальным физическим развитием, %	Доля подростков с избытком массы тела, %	Доля подростков с дефицитом массы тела, %
Общеобразовательные школы	69,7	15,1	15,1
Школы с углубленным изучением отдельных предметов	66,1	10,7	21,4
Медико-биологические классы	68,4	11,1	17,7
Школы здоровья	80,8*	3,8*	15,4

Примечание: * — $p < 0,05$ (при сравнении с группой учащихся общеобразовательных школ).

Только четверть опрошенных подростков имеет нормальную продолжительность ночного сна (8 ч и более), из них 32,9 % — мальчики и 26,7 % — девочки. У большинства школьников (51,3 % мальчиков и 50,0 % девочек) значение этого показателя составляет 6–7 ч. Еще 15,8 % мальчиков и 23,3 % девочек спят менее 6 ч. Выявлена статистически значимая корреляционная связь между дефицитом ночного сна и гармоничностью физического развития ($r = -0,59$, $p < 0,05$): среди подростков с дефицитом ночного сна распространенность избытка массы тела в 1,9 раза выше в сравнении с теми, кто спит более 8 ч (рис. 1).

Все девочки и 99,1 % мальчиков имеют дома компьютер и регулярно им пользуются, при этом 70 % школьников начали работать на компьютере в 8–11 лет, т. е. еще в начальной школе. 74,3 % старшеклассников используют компьютер ежедневно. В среднем мальчики проводят за ним $12,36 \pm 1,73$ ч в неделю, а девочки — $12,24 \pm 1,95$ ч. Распределение по группам в зависимости от продолжительности работы за компьютером в течение недели представлено в табл. 3. Между продолжительностью работы за компьютером и гармоничностью физического развития подростков выявлена статистически значимая корреляционная связь ($r = -0,44$, $p < 0,05$). Среди тех, кто пользуется компьютером более 7 ч в неделю, распространенность дефицита массы тела в 1,5 раза выше (24,6 %), чем среди тех, кто делает это менее 7 ч (16,9 %) ($p < 0,05$). Опрос показал, что 65–80 % подростков знают о возможных про-

блемах со здоровьем, но более половины опрошенных все равно не готовы отказаться от компьютера при подготовке домашних заданий и обучении в школе.

Значительное число школьников (29,3 %) отметили, что находятся в состоянии постоянного стресса в процессе обучения. Среди таких подростков в 2,3 раза больше тех, кто страдает от избытка массы тела, чем среди детей, не испытывающих стресса (13,0 и 5,6 % соответственно) ($p < 0,05$). Отсутствие конфликтов в семье отметили только 29,3 % мальчиков и 20,9 % девочек. В семьях с частыми конфликтами нормальное физическое развитие встречается у школьников в 1,5 раза реже, чем в семьях, где отсутствуют конфликтные ситуации, а дефицит массы тела — в 3 раза чаще ($p < 0,05$) ($r = -0,20$, $p < 0,05$).

Помимо школьных занятий 63,2 % мальчиков и 69,9 % девочек в среднем 2–3 раза в неделю посещают дополнительные занятия с преобладающим статическим компонентом. Средняя продолжительность таких занятий составляет 7–8 ч в неделю. Спортивные и танцевальные секции посещают 53,9 % мальчиков и 55,9 % девочек, тратя на них в среднем 5–6 ч в неделю. Среди подростков, двигательная активность которых ограничена уроками физкультуры в школе, достоверно меньше подростков с нормальным физическим развитием и достоверно больше — с избытком массы тела (рис. 3) ($p < 0,05$).

Характер питания современных школьников имеет отклонения от гигиенических требований. 30,1 % опрошенных старшеклассников никогда не завтракают, а 35,7 % никогда не обедают в школе. Три раза в день и чаще питаются только 76,3 % мальчиков и 60,0 % девочек. Горячее питание два раза в день и чаще получают только 61,8 % мальчиков и только 48,8 % девочек. Перерывы в приеме пищи более 5–6 ч отмечают 67,1 % мальчиков и 85,9 % девочек. Среди подростков, питающихся нерегулярно,

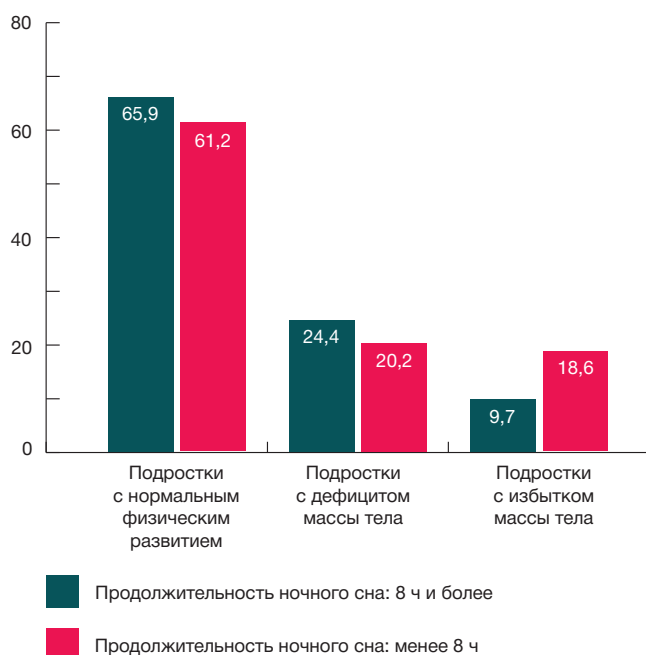


Рис. 1. Влияние продолжительности ночного сна на гармоничность физического развития московских школьников в возрасте 15–17 лет

Таблица 3. Продолжительность использования компьютера и просмотра телевизора среди московских школьников 15–17 лет

Вопрос анкеты	Вариант ответа	Мальчики	Девочки	Все
Использование компьютера, раз в неделю	1–2	8,4	7,6	7,9
	3–4	16,8	18,5	17,7
	ежедневно	74,8	73,9	74,3
Использование компьютера, ч в неделю	1–7	34,4	47,3	41,3
	8–14	22,9	25,4	24,3
	15–21	21,9	16,4	18,9
	22 и более	20,8*	10,9	15,5
Просмотр ТВ, ч в неделю	не смотрю	10,1	8,2	9,1
	1–7	54,5	52,7	53,6
	8–14	20,2	29,1	24,8
	15–21	8,1	6,4	7,2
	22 и более	7,1	3,6	5,3

дефицит массы тела встречается в 1,7 раза чаще, чем в группе ребят, питающихся регулярно (рис. 4). Выявлена статистически значимая корреляционная связь между гармоничностью физического развития и кратностью приема пищи (коэффициент сопряженности Пирсона — 0,41, $p < 0,01$, коэффициент сопряженности Крамера — 0,32, $p < 0,03$). В группе школьников, принимающих горячую пищу только один раз в день или не принимающих ее, от избытка массы тела страдает в 2 раза больше подростков, чем в группе школьников, принимающих горячую пищу дважды в день или чаще (рис. 5) ($p < 0,05$).

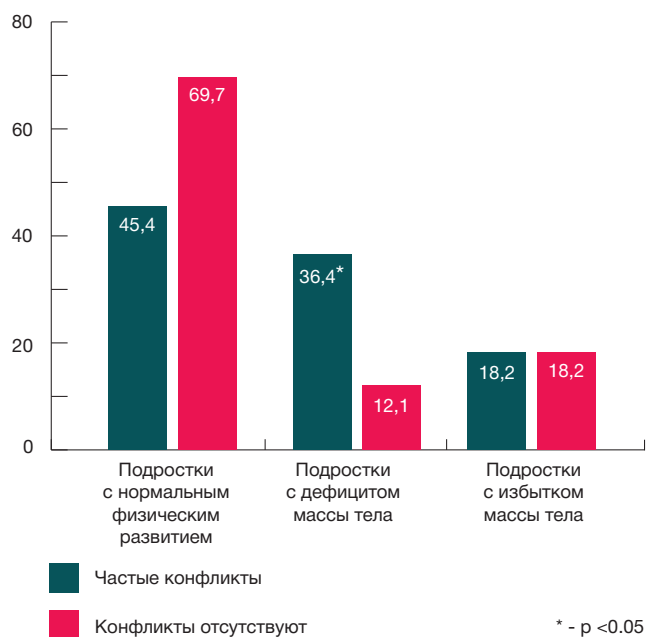


Рис. 2. Влияние психологического микроклимата в семье на гармоничность физического развития московских школьников в возрасте 15–17 лет

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Имеющиеся в литературе немногочисленные данные о влиянии различных форм организации образовательного процесса и, в частности, профильного обучения на физическое развитие детей и подростков противоречивы [12, 23, 24]. В одних исследованиях были получены данные, свидетельствующие о благоприятном влиянии профильного обучения на функциональное и психоэмоциональное состояние учащихся, в других — о негативном. Большинство результатов, полученных в нашем исследовании,

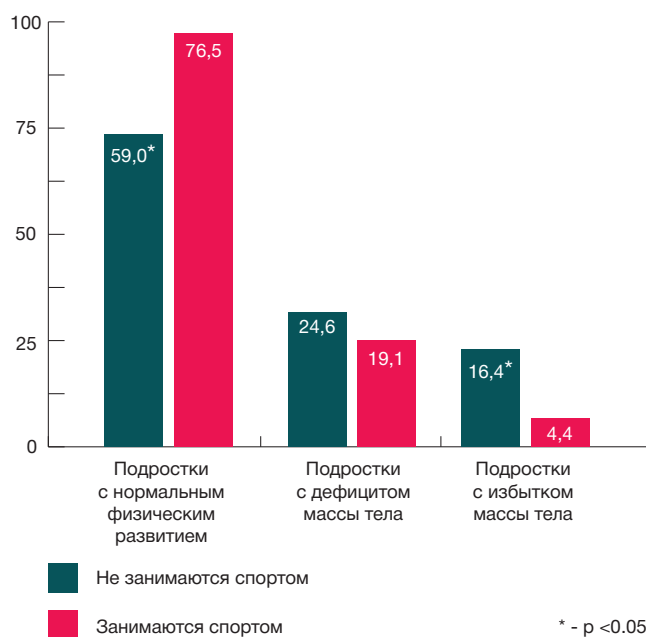


Рис. 3. Влияние дополнительных занятий спортом на гармоничность физического развития московских школьников в возрасте 15–17 лет

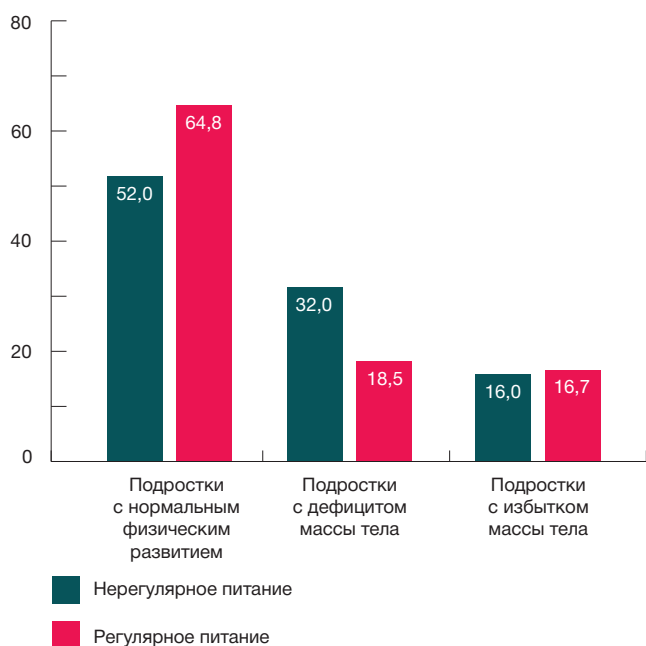


Рис. 4. Влияние регулярности питания на гармоничность физического развития московских школьников в возрасте 15–17 лет

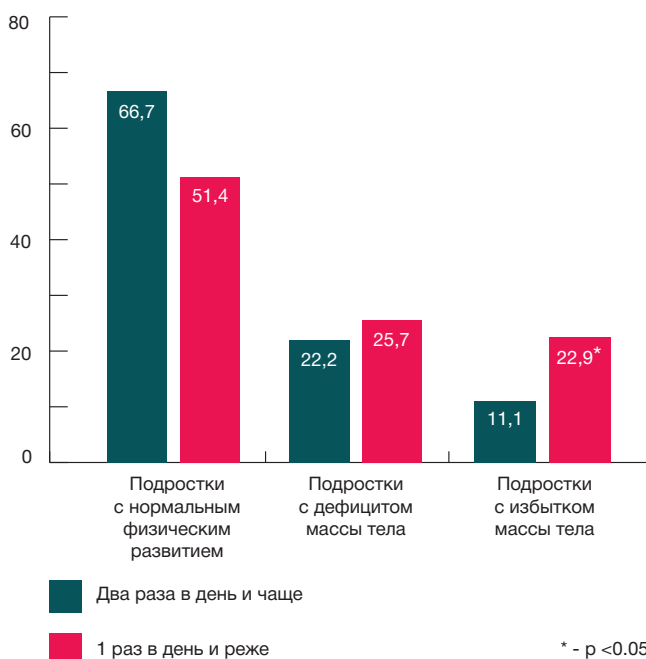


Рис. 5. Влияние кратности приема горячей пищи на гармоничность физического развития московских школьников в возрасте 15–17 лет

статистически недостоверны, но анализ влияния различных факторов (дефицит ночного сна, продолжительное использование компьютера, гиподинамия, нерегулярное питание) на физическое развитие подростков указывает на то, что наиболее неблагоприятное воздействие свойственно организации образовательного процесса, интенсифицирующей учебные нагрузки.

Полученные нами данные о негативном влиянии дефицита ночного сна на физическое развитие школьников согласуются с данными других исследований. Распространенность избытка массы тела среди детей с регулярным недосыпанием выше, чем среди детей с нормальной продолжительностью сна [25, 26].

Гиподинамия является характерной особенностью образа жизни современных детей и подростков. Уже в дошкольных образовательных учреждениях дефицит двигательной активности составляет около 30 % [27], а с момента поступления в школу двигательная активность снижается еще в 2,0–2,5 раза [28, 29]. По данным некоторых исследователей, дефицит двигательной активности среди учащихся младших классов составляет 35–40 %, а среди старшеклассников — 75–85 % [30]. Полученные нами данные о дефиците двигательной активности у старшеклассников согласуются с данными других исследований.

Неполноценное, несбалансированное, нерациональное питание в детском и юношеском возрасте отрицательно сказывается на физическом развитии, заболеваемости и успеваемости [3, 6, 31]. Результаты нашего исследования подтверждают эти данные.

В результате наиболее благополучны с точки зрения физического развития подростки в так называемых школах здоровья. Это согласуется с особенностями образовательных учреждений этого типа. В школах здоровья организовано двухразовое горячее питание (завтрак и обед), с ноября по май осуществляется дополнительная С-витаминизация третьих блюд с учетом потребности детей разных возрастных групп в витаминах, введен свободный питьевой режим. Важным направлением является организация физического воспитания учащихся. Для повышения двигательной активности учащихся введена дополнительная перемена продолжительностью 20 мин, которая отводится для подвижных игр, а на уроках проводятся физкультминутки. Учащиеся 1–4-х классов имеют в недельном расписании 5 уроков, предполагающих двигательную

активность; учащиеся 5-х классов — 4 урока; учащиеся 6–11-х классов — 3 урока. Раз в триместр организуются дни здоровья с играми и соревнованиями на открытом воздухе. В феврале есть дополнительные каникулы — спортивная неделя, во время которой дети 2–11-х классов участвуют в командных школьных соревнованиях по различным видам спорта, преимущественно на открытом воздухе. Для сохранения и укрепления нервно-психического здоровья школьников предусмотрено соблюдение максимально допустимой недельной нагрузки; составление расписания занятий с учетом физиологических кривых дневной и недельной работоспособности учащихся; сокращение продолжительности одного урока до 40 мин; личностноориентированный подход к обучению с разноуровневыми заданиями, что стало возможным благодаря снижению наполняемости классов до 22 человек; обучение педагогов определению признаков утомления при умственном труде и приемам снятия психоэмоционального напряжения учащихся; наблюдение психолога за учащимися. Особое внимание уделяется обучению школьников, их родителей и педагогов основам формирования здорового образа жизни, навыкам и принципам рационального питания, мотивации к повышению двигательной активности, дополнительным занятиям спортом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило выявить ряд факторов, оказывающих негативное влияние на формирование физического развития школьников: увеличение образовательной нагрузки, в первую очередь за счет интенсификации учебного процесса; нерегламентированное использование технических устройств, в том числе в процессе обучения; выраженная гиподинамия; выраженное психоэмоциональное напряжение и состояние стресса в процессе обучения. На физическом развитии подростков неблагоприятно сказываются дефицит ночного сна, конфликты в семье, нерегулярное питание.

Полученные результаты исследования позволили авторам разработать практические рекомендации по профилактике отклонений в физическом развитии школьников, адресованные медицинским работникам образовательных организаций, педагогам, родителям и школьникам.

Литература

1. Исламова Н. М. Морфо-функциональные особенности детей и подростков г. Набережные Челны в связи с этнической принадлежностью и влиянием факторов окружающей среды [диссертация]. М.: Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова; 2008.
2. Соколов А. Я., Заводчикова Ю. В. Уровень физического развития и типы телосложения девочек и мальчиков Магадана 7–10 лет. Гигиена и санитария. 2009; 3: 86–8.
3. Поляков В. К. Состояние здоровья школьников: соматометрические показатели, особенности питания и коррекция нарушений нутритивного статуса [диссертация]. Саратов: Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского; 2010.
4. Богомолова Е. С. Гигиеническое обоснование мониторинга роста и развития школьников в системе «здоровье–среда обитания» [диссертация]. Нижний Новгород: Нижегородская государственная медицинская академия; 2010.
5. Година Е. З., Хомякова И. А., Задорожная Л. В., Анисимова А. В., Иванова Е. М., Пермякова Е. Ю. и др. Аутоэкологические исследования на родине М. В. Ломоносова. Вестник Московского университета. Серия 23: Антропология. 2011; 3: 68–99.
6. Поварго Е. А., Зулькарнаева А. Т., Зулькарнаев Т. Р., Овсянникова Л. Б., Агафонов А. И., Ахметшина Р. А. Региональные особенности физического развития школьников Уфы. Гигиена и санитария. 2014; 93 (4): 72–4.
7. Бокарева Н. А., Скоблина Н. А., Милушкина О. Ю. Динамика физического и биологического развития московских школьников. Доктор.Ру (Педиатрия. Гастроэнтерология). 2014; 11 (99): 5–8.
8. Кучма В. Р., Скоблина Н. А., Милушкина О. Ю., Бокарева Н. А., Ямпольская Ю. А. Характеристика морфофункциональных показателей физического и биологического развития московских школьников 8–15 лет (по результатам лонгитудинальных исследований). Вестник Московского университета. Серия 23: Антропология. 2012; 1: 76–83.
9. Баранов А. А., Кучма В. Р., Скоблина Н. А., Милушкина О. Ю., Бокарева Н. А. Основные закономерности морфофункционального развития детей и подростков в современных условиях.

- виях. Вестник ПамН. 2012; 67 (12): 35–40.
10. Баранов А. А., Кучма В. Р., Скоблина Н.А. Физическое развитие детей и подростков на рубеже тысячелетий. М.: Научный центр здоровья детей ПамН; 2008. 216 с.
 11. Сухарева Л. М., Кучма В. Р., Степанова М. И., Александрова И. Э., Шумкова Т. В. Новые подходы к гигиенической оценке условий и режимов обучения в общеобразовательных учреждениях. Здоровье населения и среда обитания. 2013; 8 (245): 4–5.
 12. Миннибаев Т. Ш., Тимошенко К. Т., Рапопорт И. К. Гигиеническая оценка профильного обучения в медико-биологических классах и состоянии здоровья учащихся. Здоровье населения и среда обитания. 2010; 5: 4–7.
 13. Сухарева Л. М., Рапопорт И. К., Поленова М. А. Состояние здоровья московских школьников и факторы, влияющие на его формирование (лонгитудинальное исследование). Здоровье населения и среда обитания. 2014; 3 (252): 28–31.
 14. Милушкина О. Ю. Закономерности формирования морфофункциональных показателей детей и подростков в современных санитарно-гигиенических и медико-социальных условиях [диссертация]. М.: Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова; 2013.
 15. Бокарева Н. А. Ведущие факторы, формирующие физическое развитие современных детей мегаполиса Москвы [диссертация]. М.: Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова; 2015.
 16. Овчинникова З. А. Гигиеническая оценка влияния условий обучения на физическое развитие и состояние здоровья школьников медико-биологических классов [диссертация]. М.: Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова; 2015.
 17. Сухарев А. Г., Каневская Л. Я. Комплексная оценка воспитания и обучения детей и подростков в образовательном учреждении: методическое пособие. М.; 2001. 208 с.
 18. Баранов А. А., Кучма В. Р., редакторы. Методы исследования физического развития детей и подростков в популяционном мониторинге: руководство для врачей. М.: Союз педиатров России; 1999. 226 с.
 19. Кучма В. Р., Храмцов П. И., редакторы. Руководство по диагностике и профилактике школьно обусловленных заболеваний, оздоровлению детей в образовательных учреждениях. М.: Научный центр здоровья детей ПамН; 2012. с. 144–170.
 20. Баранов А. А., Кучма В. Р., Сухарева Л. М. Медицинские и социальные аспекты адаптации современных подростков к условиям воспитания, обучения и трудовой деятельности: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. 352 с.
 21. Головей Л. А., Рыбалко Е. Ф., редакторы. Практикум по возрастной психологии. СПб.: «Речь»; 2002. 694 с.
 22. СанПиН 2.4.2.2821–10 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям и организации обучения в общеобразовательных учреждениях». Российская газета. 2011; 5430 (54). Доступно по ссылке: <https://rg.ru/2011/03/16/sanpin-dok.html>.
 23. Зазнобова Т. В. Особенности физического развития старших-классников, обучающихся в школах разного типа. Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2010; 5: 113–6.
 24. Суворова А. В. Показатели физического развития учащихся в школах с различной формой организации учебного процесса. В сборнике: Актуальные проблемы здоровья детей и подростков и пути их решения: Материалы 3-го Всероссийского конгресса с международным участием по школьной и университетской медицине; 25–27 февраля 2012 г.; Москва, Россия. М.: Научный центр здоровья детей ПамН; 2012. с. 406–8.
 25. Taveras EM, Field AE, Berkey CS, Rufas-Shiman SL, Frazier AL, Colditz GA, Gillman MW. Longitudinal relationship between television viewing and leisure-time physical activity during adolescence. *Pediatrics*. 2007 Feb; 119 (2): e314–9.
 26. Spruyt K, Molfese DL, Gozal D. Sleep duration, sleep regularity, body weight, and metabolic homeostasis in school-aged children. *Pediatrics*. 2011 Feb; 127 (2): e345–52.
 27. Агафонова Н. А. Характеристика физической подготовленности старших дошкольников компенсирующих ортопедических групп. Здоровье населения и среда обитания. 2006; 12 (165): 20–2.
 28. Храмцов П. И., Баканов И. М. Влияние разных режимов двигательной активности на физическую работоспособность младших школьников. Здоровье населения и среда обитания. 2007; 2 (167): 7–9.
 29. Храмцов П. И., Баканов И. М. Гигиеническая оценка организации двигательной активности учащихся начальных классов школ полного дня. Гигиена и санитария. 2009; 2: 66–9.
 30. Кучма В. Р., Соколова С. Б. Поведение детей опасное для здоровья: современные тренды и формирование здорового образа жизни. М.: Научный центр здоровья детей ПамН; 2014. с. 41–3.
 31. Сметанина С. А., Суплотова Л. А., Новаковская Н. А. Эпидемиология избытка веса и ожирения у детей в возрасте 9–12 лет на юге Тюменской области. В сборнике: Материалы V Всероссийского Конгресса эндокринологов «Высокие медицинские технологии в эндокринологии»; 30 октября – 2 ноября 2006 г.; Москва, Россия. М.; 2006. с. 644.

References

1. Islamova NM. Morfo-funktsional'nye osobennosti detey i podrostkov g. Naberezhnye Chelny v svyazi s etnicheskoy prinadlezhnost'yu i vliyaniem faktorov okruzhayushchey sredy [dissertation]. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 2008. Russian.
2. Sokolov AY, Zavodchikova YuV. Uroven' fizicheskogo razvitiya i tipy teloslozheniya devochek i mal'chikov Magadana 7–10 let. *Hygiene and sanitation*. 2009; 3: 86–8. Russian.
3. Polyakov VK. Sostoyanie zdorov'ya shkol'nikov: somatometricheskie pokazateli, osobennosti pitaniya i korrektsiya narusheniy nutritivnogo statusa [dissertation]. Saratov: Razumovskiy Saratov State Medical University; 2010. Russian.
4. Bogomolova ES. Gigienicheskoe obosnovanie monitoringa rosta i razvitiya shkol'nikov v sisteme «zdorov'e-sreda obitaniya» [dissertation]. Nizhniy Novgorod: Nizhniy Novgorod State Medical Academy; 2010. Russian.
5. Godina EZ, Khomyakova IA, Zadorozhnaya LV, Anisimova AV, Ivanova EM, Permyakova EYu, et al. Auxological investigations at Mikhailo Lomonosov motherland. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 23: Antropologiya*. 2011; 3: 68–99. Russian.
6. Povargo EA, Zulkarnaeva AT, Zulkarnaev TR, Ovsyannikova LB, Agafonov AI, Akhmetshina RA. Regional features of the physical development of schoolchildren in the city of Ufa. *Hygiene and sanitation*. 2014; 93 (4): 72–4. Russian.
7. Bokareva NA, Skobolina NA, Milushkina OYu. Dinamika fizicheskogo i biologicheskogo razvitiya moskovskikh shkol'nikov. *Doktor.Ru (Pediatriya. Gastroenterologiya)*. 2014; 11 (99): 5–8. Russian.
8. Kuchma VR, Skobolina NA, Milushkina OYu, Bokareva NA, Yampolskaya YuA. Characteristics of morphofunctional indicators of Moscow schoolchildren aged 8–15 years (on the results of longitudinal studies). *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 23: Antropologiya*. 2012; 1: 76–83. Russian.
9. Baranov AA, Kuchma VR, Skobolina NA, Milushkina OYu, Bokareva NA. The main mechanisms of morphofunctional development of children and adolescents in modern conditions. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2012; 67 (12): 35–40. Russian.
10. Baranov AA, Kuchma VR, Skobolina NA. Fizicheskoe razvitie detey i podrostkov na rubezhe tysyacheletiy. M.: Nauchnyy tsentr zdorov'ya detey RAMN; 2008. 216 p. Russian.
11. Sukhareva LM, Kuchma VR, Stepanova MI, Aleksandrova IE, Shumkova TV. New approaches to the assessment of the sanitary conditions and modes of learning in educational institutions.

- Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. 2013; 8 (245): 4–5. Russian.
12. Minnibaev TSh, Timoshenko KT, Rapoport IK. Gigienicheskaya otsenka profil'nogo obucheniya v mediko-biologicheskikh klassakh i sostoyanie zdorov'ya uchashchikhsya. Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. 2010; 5: 4–7. Russian.
13. Sukhareva LM, Rapoport IK, Polenova MA. The health of he moscow schoolchildren and the factors, that influence its formation (longitudinal study). Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. 2014; 3 (252): 28–31. Russian.
14. Milushkina OYu. Zakonomernosti formirovaniya morfofunktsional'nykh pokazateley detey i podrostkov v sovremennykh sanitarno-gigienicheskikh i mediko-sotsial'nykh usloviyakh [dissertation]. Moscow: Pirogov Russian National Research Medical University; 2013. Russian.
15. Bokareva NA. Vedushchie faktory, formiruyushchie fizicheskoe razvitiye sovremennykh detey megapolisa Moskvy [dissertation]. Moscow: Pirogov Russian National Research Medical University; 2015. Russian.
16. Ovchinnikova ZA. Gigienicheskaya otsenka vliyaniya usloviy obucheniya na fizicheskoe razvitiye i sostoyanie zdorov'ya shkol'nikov mediko-biologicheskikh klassov [dissertation]. Moscow: Pirogov Russian National Research Medical University; 2015. Russian.
17. Sukharev AG, Kanevskaya LYa. Kompleksnaya otsenka vospitaniya i obucheniya detey i podrostkov v obrazovatel'nom uchrezhdenii: metodicheskoe posobie. Moscow; 2001. 208 p. Russian.
18. Baranov AA, Kuchma VR, editors. Metody issledovaniya fizicheskogo razvitiya detey i podrostkov v populyatsionnom monitoringe: rukovodstvo dlya vrachey. Moscow: Soyuz pediatrov Rossii; 1999. 226 p. Russian.
19. Kuchma VR, Khramtsov PI, editors. Rukovodstvo po diagnostike i profilaktike shkol'no obuslovlennykh zabolevaniy, ozdorovleniyu detey v obrazovatel'nykh uchrezhdeniyakh. Moscow: Nauchnyy tsentr zdorov'ya detey RAMN; 2012. p. 144–170. Russian.
20. Baranov AA, Kuchma VR, Sukhareva LM. Meditsinskie i sotsial'nye aspekty adaptatsii sovremennykh podrostkov k usloviyam vospitaniyam, obucheniya i trudovoy deyatel'nosti: rukovodstvo dlya vrachey. Moscow: GEOTAR-Media; 2007. 352 p. Russian.
21. Golovey LA, Rybalko EF, editors. Praktikum po vozrastnoy psikhologii. Saint Petersburg: "Rech"; 2002. 694 p. Russian.
22. SanPiN 2.4.2.2821–10 "Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k usloviyam i organizatsii obucheniya v obshcheobrazovatel'nykh uchrezhdeniyakh". Rossiyskaya gazeta. 2011; 5430 (54). Available from: <https://rg.ru/2011/03/16/sanpin-dok.html>. Russian.
23. Zaznobova TV. Osobennosti fizicheskogo razvitiya starsheklassnikov, obuchayushchikhsya v shkolakh raznogo tipa. Sibirskiy Medicinskij Zhurnal (Irkutsk). 2010; 5: 113–6. Russian.
24. Suvorova AV. Pokazateli fizicheskogo razvitiya uchashchikhsya v shkolakh s razlichnoy formoy organizatsii uchebnogo protsessa. In: Aktual'nye problemy zdorov'ya detey i podrostkov i puti ikh resheniya: Materialy 3-go Vserossiyskogo kongressa s mezhdunarodnym uchastiem po shkol'noy i universitetskoy meditsine; 2012 Feb 25–27; Moscow, Russia. Moscow: Nauchnyy tsentr zdorov'ya detey RAMN; 2012. p. 406–8. Russian.
25. Taveras EM, Field AE, Berkey CS, Rufas-Shiman SL, Frazier AL, Colditz GA, Gillman MW. Longitudinal relationship between television viewing and leisure-time physical activity during adolescence. Pediatrics. 2007 Feb; 119 (2): e314–9.
26. Spruyt K, Molfese DL, Gozal D. Sleep duration, sleep regularity, body weight, and metabolic homeostasis in school-aged children. Pediatrics. 2011 Feb; 127 (2): e345–52.
27. Agafonova NA. Kharakteristika fizicheskoy podgotovlennosti starshikh doshkol'nikov kompensiruyushchikh ortopedicheskikh grupp. Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. 2006; 12 (165): 20–2. Russian.
28. Khramtsov PI, Bakanov IM. Vliyanie raznykh rezhimov dvigatel'noy aktivnosti na fizicheskuyu rabotosposobnost' mladshikh shkol'nikov. Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. 2007; 2 (167): 7–9. Russian.
29. Khramtsov PI, Bakanov IM. Gigienicheskaya otsenka organizatsii dvigatel'noy aktivnosti uchashchikhsya nachal'nykh klassov shkol polnogo dnya. Hygiene and sanitation. 2009; 2: 66–9. Russian.
30. Kuchma VR, Sokolova SB. Povedenie detey opasnoe dlya zdorov'ya: sovremennye trendy i formirovaniye zdorovogo obraza zhizni. Moscow: Nauchnyy tsentr zdorov'ya detey RAMN; 2014. p. 41–3. Russian.
31. Smetanina SA, Suplotova LA, Novakovskaya NA. Epidemiologiya izbytko vesa i ozhireniya u detey v vozraste 9–12 let na yuge Tyumenskoy oblasti. In: Materialy V Vserossiyskogo Kongressa endokrinologov «Vysokie meditsinskie tekhnologii v endokrinologii»; 2006 Oct 30 – Nov 2; Moscow, Russia. Moscow; 2006. p. 644.

КОМПЕТЕНТНОСТЬ СООБЩЕСТВА МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА В ВОПРОСАХ РИСКОВ И ПОСЛЕДСТВИЙ ТАТУИРОВАНИЯ КОЖИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ОНЛАЙН-АНКЕТИРОВАНИЯ

Е. В. Трушина^{1✉}, О. В. Минкина^{1,2}, А. С. Дворников¹, П. А. Скрипкина¹, Е. И. фон Цимфер¹, Я. И. Коньшев¹

¹ Кафедра дерматовенерологии, лечебный факультет,

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² ООО «Семейный медицинский центр», Москва

В статье представлены результаты анонимного онлайн-анкетирования студенческого и преподавательского сообществ медицинского вуза по вопросам, связанным с татуированием кожи. Освещены проблемы нанесения тату-изображений с медицинской и социокультурной точек зрения. В опросе, проходившем в РНИМУ им. Н. И. Пирогова, приняли участие 210 респондентов различных возрастных групп. Анкетирование выявило недостаточный уровень знаний участников о медицинских показаниях/противопоказаниях и потенциальных осложнениях при проведении тату-процедур. Полученные данные являются достаточным основанием для начала формирования программ повышения специализированной грамотности в молодежной среде, особенно в медицинских учреждениях высшего профессионального образования. Мнение, выраженное в публикации, не обязательно отражает точку зрения и уровень знаний студенческих и преподавательских сообществ других вузов. Работа представляет собой вариант организации и проведения социальной практики для обучающихся 3-го и 4-го курсов лечебного факультета РНИМУ им. Н. И. Пирогова.

Ключевые слова: тату, татуирование, татуировка, онлайн-анкетирование, студенты медицинского вуза, медицинские противопоказания, дерматологические осложнения

✉ Для корреспонденции: Евгения Валерьевна Трушина
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; trushina.evgeniia@gmail.com

Статья поступила: 23.05.2016 Статья принята к печати: 06.06.2016

HOW AWARE ARE MEMBERS OF THE MEDICAL UNIVERSITY COMMUNITY OF THE RISKS AND CONSEQUENCES OF SKIN TATTOOING? RESULTS OF THE ONLINE SURVEY

Trushina EV^{1✉}, Minkina OV^{1,2}, Dvornikov AS¹, Skripkina PA¹, fon Zimfer EI¹, Konyshov Yal¹

¹ Department of Dermatology and Venerology, Faculty of General Medicine,
Pirogov Russian National Research University, Moscow, Russia

² Family Medical Center, ООО, Moscow, Russia

This article presents the results of an anonymous online survey on skin tattooing conducted in the community of medical students and professors. The article covers issues of tattooing from medical and sociocultural perspectives. The survey was carried out in Pirogov Russian National Research University and included 210 participants of different ages. The results demonstrate the insufficient knowledge of medical indications, contraindications and potential complications associated with tattooing. The obtained data can be a good starting point for developing programs aimed at raising awareness among young people, especially in higher medical institutions. The opinion expressed in this article is not necessarily shared by students and professors from other institutions for higher medical education and does not necessarily reflect the level of expertise in other medical communities. This work is an example of how socially oriented practical training can be organized for the 3rd and 4th-year students of the Faculty of General Medicine at Pirogov Russian National Research University.

Keywords: tattoo, tattooing, online survey, medical students, medical contraindications, dermatologic complications

✉ Correspondence should be addressed: Evgeniya Trushina
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; trushina.evgeniia@gmail.com

Received: 23.05.2016 Accepted: 06.06.2016

Украшение тела человека рисунками имеет многовековую историю, этнические и географические особенности, может нести информационную, идентификационную, религиозную или декоративную функцию. Татуировка — это подвид авангардного искусства и способ изменения внешности, при котором с помощью различных колющих инструментов нарушается целостность кожного покрова и путем введения того или иного красящего вещества наносится стойкий несмываемый (перманентный) рисунок.

Точные сведения о том, когда именно человек впервые нанес рисунок на свою кожу, отсутствуют. Происхождение полинезийской татуировки прослеживается начиная с древней, датированной III–II тысячелетиями до н. э., археологической культуры Лапита на острове Санта-Крус в архипелаге Соломоновых островов в Меланезии [1]. Первые сведения о татуировке среди европейцев относят к началу XVIII в., когда на ярмарках стали появляться татуированные люди, демонстрирующие за плату свое украшенное

тело [2]. В истории многочисленны примеры, когда с помощью татуировки клеймили провинившихся граждан, узникам концентрационных лагерей выбивали порядковые номера. Татуировку нередко используют в криминальной среде как метод иерархической идентификации [3–6].

Настоящее время можно расценивать как эпоху тату-ренессанса, когда диковинное наokoжное рисование не только стало обыденным явлением, но и приобрело огромную популярность, особенно в возрастной группе от 18 до 30 лет, практически утратив былой статус рудимента язычества и сомнительную репутацию принадлежности к криминальной среде.

С учетом стойкого интереса к татуировкам вопросы о противопоказаниях, последствиях их нанесения, а также безопасности процедуры татуирования обуславливают необходимость изменения информационного поля, особенно для будущего поколения врачей [7]. С одной стороны, должно быть понимание четкого соблюдения санитарных требований для безупречного проведения процедуры украшения тела, а с другой — нужно расширение знаний медицинского персонала о невозможности проведения процедуры при наличии противопоказаний и наступлении юридической ответственности в подобных случаях, что зачастую игнорируют как покупатели услуги, так и ее продавцы.

К категории лиц, имеющих противопоказания к нанесению татуировок, относят пациентов с сахарным диабетом, нарушениями свертывающей системы крови и заболеваниями кроветворных органов, с анамнестическими аллергическими реакциями на металлы или их химические соединения, принимающих препараты, разжижающие кровь, страдающих эпилепсией, системными аутоиммунными или онкологическими, а также острыми бактериальными и вирусными заболеваниями. В эту же категорию попадают клиенты тату-салонов в состоянии алкогольного или наркотического опьянения, а также беременные и женщины в период лактации. До настоящего времени наличие татуировки является одним из обязательных вопросов скрининг-анкетирования для потенциальных доноров крови или ее компонентов на территории РФ, а также временным противопоказанием к донорству (Приложения 1 и 2 к Приказу Минздрава РФ от 14.09.2001 № 364 «Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов»). В мировом медицинском сообществе наличие татуировки — критерий для временной отсрочки и даже отказа в донорстве крови в связи с предположительно высокой ассоциативной связью между наличием нательного рисунка и некоторыми инфекционными гемотрансфузионными заболеваниями [8–10].

В последнее время рисунки на теле стали гораздо чаще попадать в поле зрения врачей всех специальностей, и особенно дерматологов, в связи с массой осложнений, которые они вызывают. Дерматологические осложнения процедуры татуирования варьируют от возникновения острых кратковременных и поверхностных воспалительных реакций, по поводу которых пациенты не всегда обращаются за медицинской помощью, до инфекционных, стойких распространенных аллергических, фототоксических реакций, гранулематозных и лихеноидных высыпаний [11–14].

Медицинские осложнения, возникающие после проведения процедуры татуирования, в современной литературе подразделяют на категории: пиогенные инфекции (импетиго, фурункулез, целлюлит); непиогенные инфекционные заболевания (сифилис, лепра, вирусные гепатиты); дерматологические, «тату-зонированные» проявления

системных заболеваний с неясной этиологией (псориаз, красный плоский лишай, дискоидная красная волчанка); приобретенная гиперчувствительность к красителям (пигментам), применяемым для процедуры татуирования; комбинированные патологические состояния (келоидные рубцы, многоформная экссудативная эритема, лимфоаденопатия) [15].

Воспалительные реакции, как правило, манифестируют локальным отеком, зудом, гиперемией различной степени интенсивности, а также возникновением папулезных высыпаний в зоне нанесенного ранее наokoжного рисунка. По данным литературы, наиболее частым триггерным фактором для развития данного вида осложнений является красный пигмент, содержащий ртуть и ее сульфиды [16, 17] (рис. 1). Однако все чаще появляются сообщения о росте числа случаев регистрации острых и подострых воспалительных реакций и даже онкологических нозологий, связанных не столько с использованием сульфидно-ртутных красителей, сколько с новыми органическими пигментами, такими как Пигмент красный 170 и 181 [18–21].

Инфекционные осложнения в зависимости от распространенности подразделяют на поверхностные и глубокие, а в зависимости от этиологического агента — на бактериальные, вирусные или микотические (рис. 2).

Возросло число литературных источников, описывающих осложнения, вызванные различными инфекционными возбудителями при нанесении татуировок. Наравне с такими инфекционными агентами, как *Saksenaea vasiformis* [22], *Molluscum contagiosum* [23], описана встре-



Рис. 1. Воспалительная реакция в зоне нанесения рисунка на кожу тыла правой кисти, сохраняющаяся в течение 5 дней после нанесения рисунка



Рис. 2. Присоединение бактериально-микотической инфекции в области нанесения татуировки (внутренняя поверхность предплечья)

чаемость *Mycobacterium fortuitum* [24, 25], *Mycobacterium chelonae* [26, 27], *Mycobacterium haemophilum* [28], *Aspergillus fumigatus* [29], *Human papillomavirus* [30, 31].

Без подготовки компетентного кадрового состава невозможны глобальные и эффективные преобразования ни в одной структуре управления. Студенты медицинского вуза представляют собой потенциальный ресурс системы здравоохранения и должны в будущем убедительно декларировать основы и принципы здорового и безопасного образа жизни.

Целью работы было определить личную вовлеченность членов студенческого и преподавательского сообществ медицинского вуза в проблему татуировок (наличие нательных рисунков, их характер и причины нанесения), а также выяснить общий уровень информированности о медицинской стороне вопроса татуирования по результатам анонимного онлайн-анкетирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С помощью разработанной авторами анонимной онлайн-анкеты собраны и проанализированы ответы студентов, ординаторов, аспирантов, преподавателей РНИМУ им. Н. И. Пирогова, пожелавших принять участие в опросе на предмет наличия и характера татуировок, а также базового уровня знаний о медицинских показаниях/противопоказаниях и потенциальных осложнениях при проведении тату-процедур.

Была выбрана форма опроса в виде однократного сплошного группового онлайн-анкетирования, поскольку это наиболее оперативный метод сбора первичной информации, результаты анкетирования доступны и удобны для последующей математической обработки, за короткий промежуток времени представляется возможным провести опрос большого количества респондентов с минимальными материальными затратами. Электронную ссылку для прохождения опроса размещали на странице деканата лечебного факультета на официальном сайте РНИМУ им. Н. И. Пирогова, предполагая, что охват целевой аудитории наиболее крупного факультета университета позволит собрать и проанализировать максимальное количество данных за небольшой период времени.

Анкетирование проходило на добровольной основе в течение 30 заявленных дней. Информация о возможности добровольного принятия участия в анкетировании и приглашение к участию в нем были разосланы сотрудникам и студентам лечебного факультета вуза. Анкета включала 16 закрытых вопросов, предлагающих определенные варианты ответов (таблица). Выбор респондентом подходящего ему/ей варианта в ключевых вопросах определял дальнейший ход анкетирования по представленной схеме (рис. 3). Обязательным условием исследования было соблюдение анонимности опрашиваемых. Для исключения повторных ответов респондентов на период проведения анкетирования был создан короткий фильтр для блокировки входа в анкету с одного IP-адреса. На проведение опроса получено одобрение администрации вуза.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В анкетировании приняли участие 210 человек. Большинство респондентов — 140 (66,7 %) опрашиваемых — составили представительницы женского пола. Максимальное количество респондентов были в возрасте от 19 до

24 лет — 198 (94,3 %) человек. Возраст остальных участников опроса составил: 25–30 лет — 8 (3,8 %) респондентов, 16–18 лет — 1 (0,5 %) и 30–40 лет — 3 (1,4 %) человека. Согласно полученным данным, среди опрошенных 188 (89,5 %) имели незаконченное высшее образование, о законченном высшем образовании на момент проведения опроса сообщили 7 (3,3 %) человек, о наличии среднего профессионального образования — 15 (7,1 %) респондентов.

По результатам анкетирования только 16 (7,6 %) человек не знали о возможных осложнениях в процессе или после нанесения татуировки. В три раза больше, а именно 45 (21,4 %) респондентов, участвующих в процессе получения или предоставления медицинского образования, не имели представления о возможных медицинских противопоказаниях для решения принципиального вопроса о допустимости нанесения перманентного рисунка на кожу. В ходе анкетирования также выяснилось, что почти треть опрошенных, 68 (32,4 %) человек, не имели должных минимальных знаний о составе красящих веществ, вводимых подкожно.

Положительно ответили на вопрос о наличии у них татуировок на момент опроса только 15 (7,1 %) человек. Примечательно, что большую часть составляли женщины — 9 опрошенных. Представление о составе красящих веществ имели 10 (67 %) респондентов с татуировками, причем все они заинтересовались химическим составом красок до начала проведения процедуры.

По распространенности (локализации) татуировки занимают одну анатомическую область у 10 (67 %) респондентов, две и более — у 5 (33 %) человек. При этом у 9 (60 %) опрошенных рисунок на коже монохромный.

Респондентов просили назвать причины, побудившие их к нанесению татуировки. В качестве современного элемента украшения тела свой рисунок на коже расценили 9 (60 %) опрошенных; как выражение романтических отношений или напоминание о каком-либо важном событии в жизни — 4 (27 %); минимальное число опрошенных, по 1 (7 %) человеку, составили те, кто определял наличие у себя татуировки в качестве принадлежности к какой-либо социальной группе, а также использовал нанесение рисунка на кожу в качестве косметической коррекции каких-либо врожденных/приобретенных дефектов, прежнего рисунка или cover up (перекрытие).

Только 3 (20 %) респондента с татуировками задумывались об их удалении: двое — по причине косметический неудовлетворенности (потеря прежнего внешнего вида татуировки, искажение рисунка) и один опрашиваемый — по личной мотивации (надоела и/или не соответствует новому социальному статусу).

На вопрос «Планируете ли Вы сделать татуировку?» только 38 (18 %) респондентов ответили положительно, при этом в данной категории не было ни одного из уже татуированных. Основной мотивацией для нанесения рисунка на кожу максимальное количество опрошенных, а именно 20 человек, выбрали эстетический аспект и расценили потенциальную татуировку как современный элемент украшения тела. Прочими побудительными мотивами были названы: косметические (скрытие каких-либо дефектов, коррекция прежнего рисунка, cover up) — 3 человека; личные (татуировка, как выражение романтических отношений, в память о каком-либо событии) — 11; социальные (принадлежность к какой-либо социальной группе, проявление субкультурной активности) — 3; этнические/религиозные — 3 человека.

Вопросы и варианты ответов, предложенные респондентам при проведении онлайн-анкетирования

№	Вопрос	Код ответа	Варианты ответов
1	Укажите Ваш пол		- мужской - женский
2	Укажите Ваш возраст		- 16–18 - 19–20 - 21–24 - 25–30 - 31–40 - 41 и старше
3	Укажите Ваше образование		- среднее профессиональное - незаконченное высшее - законченное высшее
4	Знаете ли Вы о возможных последствиях при нанесении татуировки?		- да - нет
5	Знаете ли Вы о возможных противопоказаниях для решения вопроса о возможности нанесения татуировки?		- да - нет
6	Знаете ли Вы о составе красящих веществ, используемых при нанесении татуировок?	6.1 6.2	- да - нет
7	Есть ли у Вас татуировки?	7.1 7.2	- да - нет
8	Когда Вы заинтересовались составом красящих веществ, используемых для нанесения татуировок?		- интересовался (-ась) до нанесения татуировки - заинтересовался (-ась) во время нанесения татуировки - заинтересовался (-ась) после нанесения татуировки
9	Ваша татуировка занимает	9.1 9.2	- одну анатомическую локализацию - две и более анатомические локализации
10	Ваша татуировка...		- монохромная - цветная
11	У Вас...		- только монохромные татуировки - только цветные татуировки - комбинированные татуировки
12	Причина, побудившая Вас нанести татуировку (возможно несколько вариантов ответа)		- косметическая (скрытие каких-либо дефектов, cover up) - эстетическая (как элемент украшения тела) - личная мотивация (как выражение романтических отношений, в память о ком-либо или о каком-либо событии) - социальная (принадлежность к какой-либо социальной группе, проявление субкультурной активности) - этническая/религиозная (принадлежность к какой-либо этнической/религиозной общности) - необдуманное решение
13	Задумывались ли Вы об удалении татуировки?	13.1 13.2	- да - нет
14	Каковы причины, побудившие Вас задуматься об удалении татуировки (возможно несколько вариантов ответа)		- косметическая (потеря прежнего внешнего вида татуировки, искажение рисунка) - эстетическая (с целью убрать рисунок на теле, так как Вы не расцениваете его более в качестве украшения тела; он не соответствует более Вашему образу) - личная мотивация (надоела или не соответствует более Вашим новым отношениям) - социальная (нежелание демонстрировать принадлежность к какой-либо социальной группе, субкультурному объединению) - этническая/религиозная (нежелание демонстрировать принадлежность к какой-либо этнической/религиозной общности)
15	Планируете ли Вы сделать татуировку?	15.1 15.2	- да - нет
16	Каковы причины, мотивирующие Вас к нанесению татуировки (возможно несколько вариантов ответа)		- косметическая (скрытие каких-либо имеющихся дефектов, коррекция прежнего рисунка, cover up) - эстетическая (расцениваю татуировку в качестве современного элемента украшения тела) - личная мотивация (как выражение романтических отношений, в память о ком-либо или о каком-либо событии) - социальная (принадлежность к какой-либо социальной группе, проявление субкультурной активности) - этническая/религиозная (принадлежность к какой-либо этнической/религиозной общности)

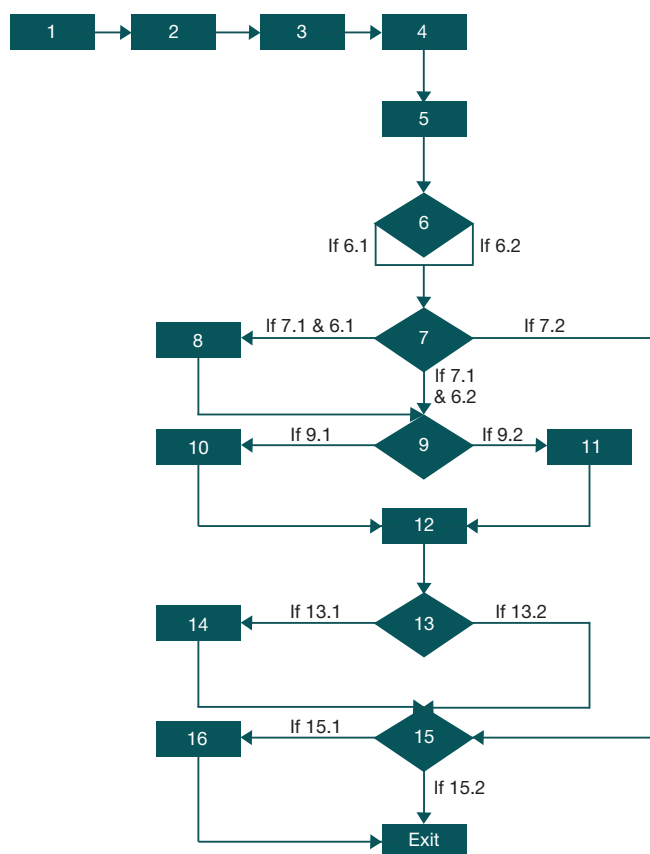


Рис. 3. Схема-алгоритм для проведения анкетирования

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным литературы, до 15 % всего населения имеет как минимум одну татуировку [32], от 10 до 30 % лиц молодого возраста также являются обладателями как минимум одного нательного рисунка, и более половины из тех, у кого татуировок еще нет, собираются нанести рисунок на кожу [33, 34]. К сожалению, пока нет точных статистических сведений о числе лиц с татуировками на территории Российской Федерации, возрасте их владельцев, а также их социальном статусе.

Полученные в ходе нашего исследования результаты принципиально не отличаются от имеющихся данных литературных источников. Только 7,1 % респондентов имели нательные изображения на момент проведения опроса. Следует также отметить немногочисленность респондентов, имеющих более одной татуировки, — 5 человек и отсутствие участников опроса, задумывающихся о повторном проведении процедуры татуирования. Эти данные позволяют высказать предположение, что в системе невербальных коммуникаций в вузе (исследуемой нами социальной группе) идеографическое маркирование тела не имеет ценности как инструмент адаптации в студенческом социуме или усиления авторитета.

Проведенное анкетирование показало, что 18 % опрошенных не исключают возможности выполнения татуировки в будущем, и только 9,5 % считают привлекательным эстетический аспект нанесения изображения. Подобный результат свидетельствует об отсутствии роста интереса интеллектуальной молодежи к декоративному смыслу нанесения нательных рисунков.

Хотя большинство участников опроса (92,4%) были осведомлены о возможных осложнениях в процессе или по-

сле нанесения татуировки, 21,4 % респондентов (1/5 всех опрошенных) не знали о медицинских противопоказаниях к нанесению перманентного нательного рисунка, а 32,4 % опрошиваемых не имели даже минимальных знаний о составе вводимых при татуировании красящих веществ. Учитывая тот факт, что анкетирование проводили в высшем учебном заведении, в котором основными задачами являются получение и предоставление медицинского образования, авторы исследования предполагали, что показатель осведомленности респондентов, а именно: базовые теоретические знания о показаниях, противопоказаниях, осложнениях и технике безопасности при процедуре нанесения татуировки, будет выше полученных данных.

Изменение внешнего вида путем нанесения перманентного изображения — ответственный шаг. Однако представление о том, что татуировка всегда будет элементом украшения кожного покрова, ошибочно. Нередко возникает необходимость избавиться от нательного рисунка для соответствия корпоративному имиджу компании, например, для соблюдения дресс-кода при трудоустройстве в банковскую сферу, силовые структуры, телевизионные компании федерального значения. По имеющимся немногочисленным данным, почти половина потребителей услуг тату-салонов пытается удалить накожный рисунок в первые 10–12 лет [35]. На сегодняшний день выведение тату производится различными способами: воздействием кислот, жидкого азота, хирургическим иссечением с последующим наложением швов, дермабразией, воздействием лазера. Однако не всегда можно устранить татуировку бесследно, до сих пор не существует идеального метода и технологий для извлечения искусственного пигмента из глубоких слоев кожи. Методы по устранению пигментации зачастую болезненны, требуют колоссальных материальных затрат, способствуют появлению гипо- или гиперпигментаций, рубцеванию кожи. Необходимо подчеркнуть, что именно респонденты проведенного исследования, участвующие в процессе получения или предоставления медицинского образования, должны обладать должной компетенцией в вопросах нанесения и удаления тату-изображений и в перспективе доносить эту информацию до населения.

ВЫВОДЫ

Согласно результатам настоящего анкетирования, общие показатели заинтересованности в нанесении нательных рисунков на кожу людей молодого возраста, обучающихся в медицинском вузе, сравнительно невысоки. Однако необходимо признать недостаточным уровень осведомленности респондентов, как будущих непосредственных исполнителей медицинских услуг, в вопросе татуирования.

Считаем целесообразным уже на первых курсах обучения в рамках преподаваемых дисциплин создавать дополнительные междисциплинарные (фундаментально-клинические) элективные циклы, в том числе с привлечением специалистов индустрии эстетической медицины. Погружение студента с первого курса в предлагаемый формат практико-применимого обучения будет способствовать формированию целостной системы универсальных знаний, развивать престижную «асимметрию знаний» у студентов-медиков по сравнению с обучающимися в других вузах, а также успешно адаптировать выпускников в социуме с учетом реальных изменений и потребностей рынка медицинских услуг.

Литература

1. Барановский В. А. Искусство татуировки. М.: Славянский дом книги; 2002.
2. Hambly WD. The history of tattooing and its significance, with some account of other forms of corporal marking. London: H. F. & G. Witherby; 1925.
3. Megargee GP, editor. The United States Holocaust Memorial Museum Encyclopedia of Camps and Ghettos, 1933–1945, Volume 1. Bloomington, Indianapolis: Indiana University Press; 2009.
4. Александров Ю. К. Очерки криминальной субкультуры. М.: Изд-во «Права человека»; 2001. с. 45–59.
5. Денисович В. В. Криминологическое значение криминальной субкультуры. Вестн. ЧелГУ. 2014; 20 (349) Вып. 40: с. 64.
6. Rozycki AT. Prison Tattoos as a Reflection of the Criminal Lifestyle and Predictor of Recidivism [dissertation]. Lubbock: Texas Tech University; 2007.
7. Heywood W, Patrick K, Smith AM, Simpson JM, Pitts MK, Richters J, et al. Who gets tattoos? Demographic and behavioral correlates of ever being tattooed in a representative sample of men and women. *Ann Epidemiol*. 2012 Jan; 22 (1): 51–6.
8. de Nishioka SA, Gyorkos TW, Joseph L, Collet JP, MacLean JD, et al. Tattooing and transfusion-transmitted diseases in Brazil: a hospital-based cross-sectional matched study. *Eur J Epidemiol*. 2003; 18 (5): 441–9.
9. Goldman M, Xi G, Yi QL, Fan W, O'Brien SF. Reassessment of deferrals for tattooing and piercing. *Transfusion*. 2009 Apr; 49 (4): 648–54.
10. Nishioka S, Gyorkos TW. Tattoos as risk factors for transfusion-transmitted diseases. *Int J Infect Dis*. 2001; 5 (1): 27–34.
11. Wenzel SM, Rittmann I, Landthaler M, Bäuml W. Adverse reactions after tattooing: review of the literature and comparison to results of a survey. *Dermatology*. 2013; 226 (2): 138–47.
12. Garcovich S, Carbone T, Avitabile S, Nasorri F, Fucci N, Cavani A. Lichenoid red tattoo reaction: histological and immunological perspectives. *Eur J Dermatol*. 2012 Jan–Feb; 22 (1): 93–6.
13. Vilaplana J, Chimenos JM, Fernández AI, Pereira-Veiga N, Romaguera C. Problems in the diagnosis of contact dermatitis by tattooing. *Exog Dermatol*. 2002; 1 (6): 307–12.
14. Islam PS, Chang C, Selmi C, Generali E, Huntley A, Teuber SS, et al. Medical Complications of Tattoos: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016 Apr; 50 (2): 273–86.
15. Elegino-Steffens DU, Layman C, Bacomo F, Hsue G. A case of severe septicemia following traditional Samoan tattooing. *Hawaii J Med Public Health*. 2013 Jan; 72 (1): 5–9.
16. Chapman G, Hildyar CA. Two decades later: a delayed red ink tattoo reactions. *BMJ Case Rep*. 2014 Jan 10; 2014. pii: bcr2013201726.
17. Rostenberg A Jr, Brown RA, Caro MR. Discussion of tattoo reactions with report of a case showing a reaction to a green color. *AMA Arch Derm Syphilol*. 1950 Oct; 62 (4): 540–7.
18. Kazlouskaya V, Junkins-Hopkins JM. Pseudoepitheliomatous hyperplasia in a red pigment tattoo: a separate entity or hypertrophic lichen planus-like reaction? *J Clin Aesthet Dermatol*. 2015 Dec; 8 (12): 48–52.
19. Joyce CW, Duff G, McKenna D, Regan PJ. Malignant melanoma arising in red tattoo ink. *Arch Plast Surg*. 2015 Jul; 42 (4): 475–7.
20. Steinbrecher I, Hemmer W, Jarisch R. [Adverse reaction to the azo dye Pigment Red 170 in a tattoo]. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2004 Dec; 2 (12): 1007–8. German.
21. Feldstein S, Jagdeo J. Successful medical treatment of a severe reaction to red tattoo pigment. *J Drugs Dermatol*. 2014 Oct; 13 (10): 1274–5.
22. Parker C, Kaminski G, Hill D. Zygomycosis in a tattoo, caused by *Saksenaea vasiformis*. *Australas J Dermatol*. 1986 Dec; 27 (3): 107–11.
23. Foulds IS. Molluscum contagiosum: an unusual complication of tattooing. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982 Aug 28–Sep 4; 285 (6342): 607.
24. Philips RC, Hunter-Ellul LA, Martin JE, Wilkerson MG. Mycobacterium fortuitum infection arising in a new tattoo. *Dermatol Online J*. 2014 Jun 15; 20 (6). pii: 13030/qt6bs3q0h0.
25. Suvanasuthi S, Wongpraparut C, Pattanaprichakul P, Bunyaratavej S. Mycobacterium fortuitum cutaneous infection from amateur tattoo. *J Med Assoc Thai*. 2012 Jun; 95 (6): 834–7.
26. Giulieri S, Cavassini M, Jaton K. Mycobacterium chelonae illnesses associated with tattoo ink. *N Engl J Med*. 2012 Dec 13; 367 (24): 2357; author reply 2357–8.
27. Sergeant A, Conaglen P, Laurensen IF, Claxton P, Mathers ME, Kavanagh GM, et al. Mycobacterium chelonae infection: a complication of tattooing. *Clin Exp Dermatol*. 2013 Mar; 38 (2): 140–2.
28. Kay MK, Perti TR, Duchin JS. Tattoo-associated Mycobacterium haemophilum skin infection in immunocompetent adult, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2011 Sep; 17 (9): 1734–6.
29. Kluger N, Saarinen K. Aspergillus fumigatus infection on a home-made tattoo. *Br J Dermatol*. 2014 Jan; 170 (6): 1373–5.
30. Wanat KA, Tying S, Rady P, Kovarik CL. Human papillomavirus type 27 associated with multiple verruca within a tattoo: report of a case and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2014 Jul; 53 (7): 882–4.
31. Trefzer U, Schmollack KP, Stockfleth E, Sterry W, Kolde G. Verrucae in a multicolored decorative tattoo. *J Am Acad Dermatol*. 2004 Mar; 50 (3): 478–9.
32. Kluger N. Epidemiology of tattoos in industrialized countries. *Curr Probl Dermatol*. 2015; 48: 6–20.
33. Armstrong ML, Murphy KP. Tattooing: another adolescent risk behavior warranting health education. *Appl Nurs Res*. 1997 Nov; 10 (4): 181–9.
34. Makkai T, McAllister I. Prevalence of tattooing and body piercing in the Australian community. *Commun Diss Intell Q Rep*. 2001 Apr; 25 (2): 67–72.
35. Khunger N, Molpariya A, Khunger A. Complications of Tattoos and Tattoo Removal: Stop and Think Before you ink. *J Cutan Aesthet Surg*. 2015 Jan–Mar; 8 (1): 30–6.

References

1. Baranovskii VA. Iskustvo tatiurovki. Moscow: Slavyanskii dom knigi; 2002. Russian.
2. Hambly WD. The history of tattooing and its significance, with some account of other forms of corporal marking. London: H. F. & G. Witherby; 1925.
3. Megargee GP, editor. The United States Holocaust Memorial Museum Encyclopedia of Camps and Ghettos, 1933–1945, Volume 1. Bloomington, Indianapolis: Indiana University Press; 2009.
4. Aleksandrov YuK. Ocherki kriminal'noi subkul'tury. Moscow: Human Rights Publishers; 2001. p. 45–59. Russian.
5. Denisovich VV. Kriminologicheskoe znachenie kriminal'noi subkul'tury. Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta. 2014; 20 (349) Suppl 40: p. 64. Russian.
6. Rozycki AT. Prison Tattoos as a Reflection of the Criminal Lifestyle and Predictor of Recidivism [dissertation]. Lubbock: Texas Tech University; 2007.
7. Heywood W, Patrick K, Smith AM, Simpson JM, Pitts MK, Richters J, et al. Who gets tattoos? Demographic and behavioral correlates of ever being tattooed in a representative sample of men and women. *Ann Epidemiol*. 2012 Jan; 22 (1): 51–6.
8. de Nishioka SA, Gyorkos TW, Joseph L, Collet JP, MacLean JD, et al. Tattooing and transfusion-transmitted diseases in Brazil: a hospital-based cross-sectional matched study. *Eur J Epidemiol*. 2003; 18 (5): 441–9.
9. Goldman M, Xi G, Yi QL, Fan W, O'Brien SF. Reassessment of deferrals for tattooing and piercing. *Transfusion*. 2009 Apr; 49 (4): 648–54.

10. Nishioka S, Gyorkos TW. Tattoos as risk factors for transfusion-transmitted diseases. *Int J Infect Dis*. 2001; 5 (1): 27–34.
11. Wenzel SM, Rittmann I, Landthaler M, Bäuml W. Adverse reactions after tattooing: review of the literature and comparison to results of a survey. *Dermatology*. 2013; 226 (2): 138–47.
12. Garcovich S, Carbone T, Avitabile S, Nasorri F, Fucci N, Cavani A. Lichenoid red tattoo reaction: histological and immunological perspectives. *Eur J Dermatol*. 2012 Jan–Feb; 22 (1): 93–6.
13. Vilaplana J, Chimenos JM, Fernández AI, Pereira-Veiga N, Romaguera C. Problems in the diagnosis of contact dermatitis by tattooing. *Exog Dermatol*. 2002; 1 (6): 307–12.
14. Islam PS, Chang C, Selmi C, Generali E, Huntley A, Teuber SS, et al. Medical Complications of Tattoos: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016 Apr; 50 (2): 273–86.
15. Elegino-Steffens DU, Layman C, Bacomo F, Hsue G. A case of severe septicemia following traditional Samoan tattooing. *Hawaii J Med Public Health*. 2013 Jan; 72 (1): 5–9.
16. Chapman G, Hildy CA. Two decades later: a delayed red ink tattoo reactions. *BMJ Case Rep*. 2014 Jan 10; 2014. pii: bcr2013201726.
17. Rostenberg A Jr, Brown RA, Caro MR. Discussion of tattoo reactions with report of a case showing a reaction to a green color. *AMA Arch Derm Syphilol*. 1950 Oct; 62 (4): 540–7.
18. Kazlouskaya V, Junkins-Hopkins JM. Pseudoepitheliomatous hyperplasia in a red pigment tattoo: a separate entity or hypertrophic lichen planus-like reaction? *J Clin Aesthet Dermatol*. 2015 Dec; 8 (12): 48–52.
19. Joyce CW, Duff G, McKenna D, Regan PJ. Malignant melanoma arising in red tattoo ink. *Arch Plast Surg*. 2015 Jul; 42 (4): 475–7.
20. Steinbrecher I, Hemmer W, Jarisch R. [Adverse reaction to the azo dye Pigment Red 170 in a tattoo]. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2004 Dec; 2 (12): 1007–8. German.
21. Feldstein S, Jagdeo J. Successful medical treatment of a severe reaction to red tattoo pigment. *J Drugs Dermatol*. 2014 Oct; 13 (10): 1274–5.
22. Parker C, Kaminski G, Hill D. Zygomycosis in a tattoo, caused by *Saksenaia vasiformis*. *Australas J Dermatol*. 1986 Dec; 27 (3): 107–11.
23. Foulds IS. *Molluscum contagiosum*: an unusual complication of tattooing. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982 Aug 28–Sep 4; 285 (6342): 607.
24. Phillips RC, Hunter-Ellul LA, Martin JE, Wilkerson MG. *Mycobacterium fortuitum* infection arising in a new tattoo. *Dermatol Online J*. 2014 Jun 15; 20 (6). pii: 13030/qt6bs3q0h0.
25. Suvanasuthi S, Wongpraparut C, Pattanaprichakul P, Bunyaratavej S. *Mycobacterium fortuitum* cutaneous infection from amateur tattoo. *J Med Assoc Thai*. 2012 Jun; 95 (6): 834–7.
26. Giulieri S, Cavassini M, Jaton K. *Mycobacterium chelonae* illnesses associated with tattoo ink. *N Engl J Med*. 2012 Dec 13; 367 (24): 2357; author reply 2357–8.
27. Sergeant A, Conaglen P, Laurenson IF, Claxton P, Mathers ME, Kavanagh GM, et al. *Mycobacterium chelonae* infection: a complication of tattooing. *Clin Exp Dermatol*. 2013 Mar; 38 (2): 140–2.
28. Kay MK, Perti TR, Duchin JS. Tattoo-associated *Mycobacterium haemophilum* skin infection in immunocompetent adult, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2011 Sep; 17 (9): 1734–6.
29. Kluger N, Saarinen K. *Aspergillus fumigatus* infection on a home-made tattoo. *Br J Dermatol*. 2014 Jan; 170 (6): 1373–5.
30. Wanat KA, Tying S, Rady P, Kovarik CL. Human papillomavirus type 27 associated with multiple verruca within a tattoo: report of a case and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2014 Jul; 53 (7): 882–4.
31. Trefzer U, Schmollack KP, Stockfleth E, Sterry W, Kolde G. Verrucae in a multicolored decorative tattoo. *J Am Acad Dermatol*. 2004 Mar; 50 (3): 478–9.
32. Kluger N. Epidemiology of tattoos in industrialized countries. *Curr Probl Dermatol*. 2015; 48: 6–20.
33. Armstrong ML, Murphy KP. Tattooing: another adolescent risk behavior warranting health education. *Appl Nurs Res*. 1997 Nov; 10 (4): 181–9.
34. Makkai T, McAllister I. Prevalence of tattooing and body piercing in the Australian community. *Commun Diss Intell Q Rep*. 2001 Apr; 25 (2): 67–72.
35. Khunger N, Molpariya A, Khunger A. Complications of Tattoos and Tattoo Removal: Stop and Think Before you ink. *J Cutan Aesthet Surg*. 2015 Jan–Mar; 8 (1): 30–6.



РНИМУ им. Н. И. Пирогова
www.rsmu.ru