

ЖУРАКОВСКИЙ ИГОРЬ ПАВЛОВИЧ

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ МАТРИКС-ПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК
И ИХ МИКРООКРУЖЕНИЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ
СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Новосибирск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Доктор медицинских наук, профессор **Пустоветова Мария Геннадьевна**

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук **Обухова Лидия Александровна**

(Новосибирский государственный университет, профессор кафедры физиологии факультета естественных наук)

Доктор медицинских наук, профессор **Шурлыгина Анна Вениаминовна**

(Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Новосибирск, заведующий лабораторией иммуноморфологии)

Доктор медицинских наук, профессор **Трунов Александр Николаевич**

(Научный центр клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Новосибирск, руководитель лаборатории иммунологии репродукции, главный научный сотрудник)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2013 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.06.05, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52, тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52)

Автореферат разослан « ____ » _____ 2013г

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Соединительная ткань, выполняющая интегральные функции в организме, характеризуется значительной фенотипической гетерогенностью, являясь «плацдармом» всех физиологических и патологических процессов. Особого внимания заслуживает проблема изменений активности матрикс-продуцирующих клеток и перестройка внеклеточного матрикса при различных патологических состояниях (Capila I. et al., 2002; Powell A.K. et al., 2004; Whitelock J.M. et al., 2005; Lindahl U. et al., 2009). В условиях бактериальной инфекции, сопровождающейся гипоксией органов и тканей, лежащей в основе стереотипных и специфических реакций, например апоптоза (Hotchkiss R.S. et al., 2009; Duprez L. et al., 2009; Wyllie A.H. et al., 2010; Fulda S. et al., 2010), развивается ремоделирование соединительной ткани с изменением экспрессии генов индукторов и ингибиторов апоптоза в матрикс-продуцирующих клетках и изменение их пролиферативной активности.

Стафилококковая инфекция на протяжении более 50 лет является одной из наиболее важных проблем медицинской науки. Метициллин-устойчивые штаммы *Staphylococcus aureus* являются одной из основных причин заболеваемости и смертности во многих странах (Klevens R.M. et al., 2007; Green B.N. et al., 2012). Выраженным проявлениям инфекционного процесса, вызванного стафилококками, уделяется пристальное внимание (Stott N.S., 2001; Nade S., 2003; Levine M., Siegel L.B., 2003; Lew D.P., Waldvogel F.A., 2004; Weichert S. et al., 2008). Вместе с тем, несмотря на то, что минорные взаимодействия макро- и микроорганизмов являются не менее значимыми, они еще не достаточно изучены.

Нарушения светопериодичности в связи с изменившимися социально-экономическими условиями (вахтовый режим работы, смена часовых поясов при перелетах и т.п.) ведет к изменению биологических ритмов в работе органов и систем организма (Труфакин В.А. и др., 1991; Шурлыгина А.В., Труфакин В.А., 1993; Ко С.Н., Takahashi J.S., 2006; Stevens R.G., 2007).

Гормон эпифиза (мелатонин) наряду с ритморганизующим эффектом (Анисимов В.Н. и др., 1990; Cahill G.M. et al., 1991; Brainard G.C. et al., 2001) обладает выраженным антиоксидантным и иммуномодулирующим действием (Кветная Т.В., Князькин И.В., 2003; Tomás-Zapico C., Coto-Montes A. A., 2005; Manda K. et al., 2007) и привлекает пристальное внимание в аспекте коррекции различных дизадаптивных процессов. Кроме того к факторам физической природы, оказывающим благотворное воздействие на организм, относят световое излучение с длиной волны 440-485 нм,

которое улучшает реологические свойства крови и усиливает местный иммунитет (Карандашов В.И. и др., 2004, 2009).

Вместе с тем, не изучены структурно-функциональные особенности матрикс-продуцирующих клеток волокнистого хряща межпозвонковых дисков, плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани сетчатого слоя дермы, рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани стромы паренхиматозных органов при длительной стафилококковой инфекции, развивающейся в условиях круглосуточного освещения. Не исследовано корригирующее влияние искусственного монохромного (синего) света и мелатонина на клеточный и волокнистый компоненты разных типов соединительной ткани.

Цель исследования. Изучить системную реакцию матрикс-продуцирующих клеток и их микроокружения при моделировании стафилококковой инфекции в динамике нарушения светового режима (круглосуточное освещение) и в условиях корригирующих воздействий мелатонина и монохромного синего света.

Задачи исследования

1. Провести структурно-функциональное исследование матрикс-продуцирующих клеток волокнистого хряща межпозвонковых дисков и их микроокружения при моделировании стафилококковой инфекции.

2. Выполнить комплексное гистологическое и иммуногистохимическое исследование структурных элементов волокнистого хряща в условиях коррекции вторичной системной дезорганизации соединительной ткани и на фоне светового десинхроноза.

3. Оценить структурно-функциональные характеристики матрикс-продуцирующих клеток плотной волокнистой соединительной ткани сетчатого слоя дермы и их микроокружения в динамике эксперимента.

4. Провести комплексное гистологическое и иммуногистохимическое исследование структурных элементов плотной волокнистой соединительной ткани сетчатого слоя дермы в условиях коррекции и на фоне светового десинхроноза.

5. Изучить структурно-функциональные особенности матрикс-продуцирующих клеток рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани печени при длительной стафилококковой инфекции.

6. Выполнить комплексное гистологическое и иммуногистохимическое исследование структурных элементов рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани печени в условиях коррекции и при нарушении светового режима.

7. Разработать концепцию стратегий ремоделирования различных типов

соединительной ткани при хронической стафилококковой инфекции и в условиях сочетания с дестабилизирующим и корригирующим воздействием.

Научная новизна. Впервые создана экспериментальная модель вторичной дезорганизации соединительной ткани, позволившая выявить особенности реагирования матрикс-продуцирующих клеток разных типов соединительной ткани и их микроокружения при хронической стафилококковой инфекции.

Разработана концепция ремоделирования разных типов соединительной ткани, отражающая роль стафилококковой инфекции в развитии вторичной системной дезорганизации соединительной ткани, согласно которой выделяются два основных типа стратегии структурно-функционального реагирования: 1) преимущественно дистрофически-дегенеративное (волокнистый хрящ, плотная волокнистая неоформленная ткань); 2) с развитием преимущественно фиброзных изменений (рыхлая волокнистая неоформленная соединительная ткань).

В волокнистом хряще межпозвонковых дисков обнаружены дегенеративные изменения клеточного компартмента с доминированием проявлений парциальной аутофагии и снижением биосинтетических процессов, изменения количественно-качественных параметров коллагеновых волокон, прогрессирующее снижение содержания сульфатированных гликозаминогликанов, достоверное увеличение содержания нейтральных гликопротеинов в сочетании с компенсаторной реакцией в виде индуцирования внутриклеточных регенераторных процессов в некоторых резидентных клетках и рекрутировании перицитов на фоне усиления кровоснабжения в наружных отделах фиброзных колец.

В плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани сетчатого слоя дермы продемонстрированы инициализация и пролонгирование проапоптотических изменений клеточных элементов на фоне снижения их пролиферативной способности; резкое снижение сульфатированных гликозаминогликанов; нарушение компактного расположения коллагеновых волокон, уменьшение их относительного содержания, изменение соотношения основных типов коллагеновых волокон; увеличение содержания нейтральных гликопротеинов, при изменении соотношения их фракций; миграция тучных клеток в наружные отделы сетчатого слоя дермы, увеличение популяции тучных клеток в гиподерме.

Получены новые сведения, доказывающие существование наряду с классическим вариантом развития фиброза, реализующимся вследствие активации макрофагами звездчатых клеток печени, альтернативного механизма – активирование фибробластов порталных трактов тучными клетками.

Впервые продемонстрированы структурные механизмы сочетанного

воздействия стафилококковой инфекции и круглосуточного освещения у животных, по сравнению с крысами, содержащимися при естественном ритме светового режима: более выраженные дистрофически-дегенеративные изменения преимущественно в фиброзном кольце межпозвонковых дисков; выраженное снижение пула клеточных элементов плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани кожи, продуцирующих антиапоптотический белок Bcl-2, на фоне увеличения количества фибробластов, экспрессирующих проапоптотический белок Bax, что способствует активизации процесса инициации апоптоза; более выраженные изменения волокнистого компонента и аморфного вещества внеклеточного матрикса плотной волокнистой соединительной ткани, представленной сетчатым слоем кожи, что в полной мере соответствует патологическим изменениям матрикс-продуцирующих клеток; индукция фиброгенеза вследствие неспецифического реактивного гепатита; активация апоптоза синусоидальных клеток; снижение мононуклеарной клеточной инфильтрации в печени.

Впервые показана эффективность мелатонина (в дозе 1 мг/кг веса) для коррекции проявлений вторичной системной дезорганизации соединительной ткани: в волокнистом хряще межпозвонковых дисков – уменьшение дистрофически-дегенеративных изменений, активация ангиогенеза в наружном отделе фиброзного кольца, увеличение количества двуядерных нотохордальных клеток; в плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани сетчатого слоя дермы – снижение экспрессии проапоптотических белков, возрастание пролифератической активности фибробластов; в рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани печени – торможение фиброзных изменений.

Представлены новые данные о системном эффекте монохромного синего света на печень животных при наличии очага бактериальной инфекции: индукция внутриклеточной регенерации в печени (увеличение количества двуядерных гепатоцитов); нормализация микроциркуляции (отсутствие агрегации эритроцитов и дилатации синусоидных капилляров), снижение воспалительной реакции, уменьшение количества тучных клеток, редукция фиброзных изменений (преимущественно за счет снижения количества сульфатированных гликозаминогликанов).

Теоретическая и практическая значимость работы. С помощью комплексного структурно-функционального исследования получены новые данные, раскрывающие последовательность ремоделирования разных типов соединительной ткани при хроническом течении стафилококковой инфекции. Проведенные исследования дополняют имеющиеся сведения о патогенезе синдрома сочетанных

дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе.

С помощью иммуногистохимического и морфометрического исследования доказана корригирующая роль мелатонина (в дозе 1 мг/кг веса) для предотвращения развития вторичной системной дезорганизации соединительной ткани при наличии очага хронической бактериальной инфекции.

Полученная модель вторичной дезорганизации соединительной ткани может быть основой для дальнейшего изучения патологии мезенхимальных производных, возникших в результате хронической бактериальной инфекции, например, для решения вопроса об обратимости дистрофических изменений при прекращении действия этиологического фактора, для изучения влияния на различные (и прежде всего начальные) стадии системной реакции соединительной ткани биологически активных препаратов, лекарственных и физиотерапевтических средств.

Результаты исследования раскрывают молекулярно-клеточные, микро- и ультраструктурные основы патогенеза патологических и адаптивно-компенсаторных изменений в разных типах соединительной ткани при длительной стафилококковой инфекции, круглосуточном освещении и в динамике коррекции, что может иметь значение для разработки новых способов профилактики и лечения проявлений синдрома дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных.

Положения, выносимые на защиту

1. Длительное воздействие стафилококковой инфекции, сопровождающееся активацией системы мононуклеарных фагоцитов, приводит к вторичной системной дезорганизации соединительной ткани, проявляющейся:

- дистрофически-дегенеративными изменениями клеточных элементов и ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса волокнистого хряща межпозвонковых дисков;
- инициацией и пролонгированием процессов апоптоза в фибробластах плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани сетчатого слоя дермы, что сопровождается изменением качественно-количественных характеристик внеклеточного матрикса;
- развитием фиброзных изменений в печени.

2. Круглосуточное освещение усиливает дистрофически-дегенеративные изменения клеточных элементов и внеклеточного матрикса в межпозвонковых дисках, стимулирует апоптотические процессы по митохондриальному пути в сетчатом слое дермы, способствует развитию более выраженных проявлений фиброза печени.

3. Применение мелатонина в дозе 1 мг/кг веса способствует:

- уменьшению выраженности дистрофически-дегенеративных изменений в межпозвонковых дисках, препятствуя развитию парциальной атрофии в хондроцитах/хондробластах фиброзного кольца и нотохордальных клетках пульпозного ядра, способствует нормализации структурных компонентов экстрацеллюлярного матрикса;
- усилению экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и снижению экспрессии проапоптотических белков Bad и Bax в фибробластах сетчатого слоя дермы, что приводит к улучшению качественно-количественных характеристик внеклеточного матрикса;
- препятствует развитию фиброзных изменений в печени.

4. Общее воздействие монохромным синим светом оказывает лечебный эффект при неспецифическом реактивном гепатите, заключающийся в уменьшении расширения и отечности портальных трактов, отсутствии их инфильтрации мононуклеарными клетками, нормализации печеночной гемодинамики и микроциркуляции, уменьшении дистрофических изменений паренхиматозных клеток в печени и отсутствии некрозов клеточных элементов, приобретении синусоидными клетками обычного строения, уменьшении количества тучных клеток в области портальных трактов.

Диссертация выполнена по плану научно-исследовательских работ Новосибирского государственного медицинского университета. Тема «Изучение патофизиологических механизмов влияния света и других факторов экзогенной и эндогенной природы на организм» (регистрационный номер 01200959105 от 15.09.2009г).

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клинико-морфологические аспекты общепатологических процессов при социально-значимых заболеваниях» (Новосибирск, 2004), на Научной конференции с международным участием «Проблемы лимфологии и интерстициального массопереноса» (Новосибирск, 2004), на Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2008), на IX Российско-германской научно-практической конференции им. Р. Коха и И.И. Мечникова «Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении» (Новосибирск, 2010), на V Всероссийском симпозиуме с международным участием «Проблемы адаптации человека к экологическим и социальным условиям Севера» (Сыктывкар, 2010), на III Всероссийской научно-

практической конференции с международным участием «Вопросы типовых патологических процессов» (Новосибирск, 2011), на V Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2011), на IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы внутренней патологии. Дисплазия соединительной ткани» (Омск, 2011), на IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов» (Новосибирск, 2012), на II Всероссийской конференции с международным участием «Профилактическая медицина» (Санкт-Петербург, 2012).

Внедрение. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс Новосибирского государственного медицинского университета: кафедры дерматовенерологии и косметологии лечебного факультета и используются в процессе обучения студентов по курсу дерматологии, в разделе «Патологические изменения кожных покровов при заболеваниях органов и систем»; кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета по патофизиологии, в разделе «Патогенез хронических воспалительных заболеваний»; кафедры поликлинической терапии и общей врачебной практики (семейной медицины) лечебного факультета по курсу поликлинической терапии, в разделах «Дистрофически-дегенеративные заболевания опорно-двигательной системы», «Системные заболевания соединительной ткани». Результаты диссертационной работы использованы при планировании экспериментов и трактовке научных результатов в Центральной научно-исследовательской лаборатории Новосибирского государственного медицинского университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 54 научные работы, в том числе 14 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций материалов диссертации, 3 монографии, получены 3 патента РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 420 страницах машинописного текста, состоит из введения, 10 глав, заключения и выводов, содержит 150 рисунков и 54 таблицы. Указатель литературы содержит 550 источников, из них 57 отечественных и 493 зарубежных авторов.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в создании экспериментальной модели, непосредственно провел комплексное исследование с использованием световой, электронной микроскопии, иммуногистохимического исследования, морфометрического анализа и статистической обработки результатов.

Результаты иммуноферментного исследования сыворотки крови получены совместно с н.с. М.В. Битхасовой (Центральная научно-исследовательская лаборатория Новосибирского государственного медицинского университета).

На основании проведенного исследования автором выявлены стратегии структурно-функционального реагирования разных типов соединительной ткани, сформулирована концепция развития вторичной системной дезорганизации соединительной ткани при наличии очага хронической инфекции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание экспериментальной модели. Модель вторичной дезорганизации соединительной ткани (Патент № 2307397 РФ) получена с помощью инокуляции 209 штамма *Staphylococcus aureus* при использовании 25 кроликов породы Шиншилла, из них 9 – контрольные животные.

После предварительной премедикации 5 % раствором тиопентала натрия 4 мл в/м и асептической обработки, под общим ингаляционным эфирным наркозом производили разрез кожи длиной 3 см в области медиального мыщелка большеберцовой кости. После трепанации большеберцовой кости дрелью в отверстие диаметром 2 мм вводили хлопчатобумажную нить длиной 7 см, предварительно помещенную на 30 минут в смыв с суточной культуры *Staphylococcus aureus* (штамм 209). У животных развивался острый остеомиелит большеберцовой кости, который через 1 мес. приобретал черты хронического. Забор материала осуществляли через 1, 2, 3, 5 и 8 мес. после инокуляции микроорганизмов.

Для изучения начальных проявлений вторичной системной дезорганизации соединительной ткани в динамике коррекции и нарушения светового режима эксперимент проведен на 60 половозрелых крысах-самцах Вистар с массой тела 180-220 г (табл. 1).

Таблица 1 – Дизайн эксперимента по изучению начальных проявлений вторичной системной дезорганизации соединительной ткани в динамике нарушения светового режима и коррекции

Экспериментальные группы крыс Вистар	Условия воздействия	Количество животных в группах	Сроки забора материала, обозначение подгрупп
1-я группа	Интактные животные	6	2 (инт)
2-я группа	Инокуляция 209 штамма <i>Staphylococcus aureus</i> в большеберцовую кость крыс Вистар	18	1 мес., (В 1); 2 мес., (В 2); 3 мес., (В 3)

Продолжение таблицы 1

Экспериментальные группы крыс Вистар	Условия воздействия	Количество животных в группах	Сроки забора материала, обозначение подгрупп
3-я группа	Инокуляция 209 штамма <i>Staphylococcus aureus</i> в большеберцовую кость; через 1,5 мес. – круглосуточное освещение в течение 2 нед.	12	2 мес., (ВД 2); 3 мес., (ВД 3)
4-я группа	Инокуляция 209 штамма <i>Staphylococcus aureus</i> в большеберцовую кость; через 1,75 мес. – введение мелатонина в дозе 1 мг/кг в течение 1 нед.	12	2 мес., (ВМ 2) 3 мес., (ВМ 3)
5-я группа	Инокуляция 209 штамма <i>Staphylococcus aureus</i> в большеберцовую кость; через 1,5 мес. – общее воздействие монохромным синим светом в течение 2 нед.	12	2 мес., (ВС 2); 3 мес., (ВС 3)

Все эксперименты выполняли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей.

Световая микроскопия. Образцы органов и тканей экспериментальных животных фиксировали в 12 % формалине. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином. Коллагеновые волокна выявляли пикрофуксином по ван Гизону, сульфатированные гликозаминогликаны – альциановым синим при pH 1,0, нейтральные гликопротеины – с помощью PAS реакцией по McManus (Роскин Г.И., Левинсон Л.Б., 1957; Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996).

Электронная микроскопия. Образцы объемом не более 2 мм³ фиксировали в 4 % параформальдегиде, приготовленном на фосфатном буфере Миллони (pH = 7,4), постфиксировали в 1 % растворе четырехоксида осмия и после дегидратации в серии спиртов и ацетоне заключали в смесь эпон и аралдита. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим, ультратонкие контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и анализировали в электронном микроскопе JEM-100S (ЦИЛ НГМУ МЗ РФ) и JEM-1400 (ФГБУ НИИ Физиологии СО РАМН), фотографировали с помощью цифровой камеры Veleta и программного обеспечения

iTEM (Olympus, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВт.

Иммуногистохимическое исследование. Для подготовки гистологических препаратов для иммуногистохимического анализа использовали стандартный метод фиксации тканей в нейтральном формалине с последующей дегитратацией и заливкой в парафин. Иммуногистохимическое исследование по оценке уровней экспрессии белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bad, Bax, p53) и маркеров клеточной пролиферации (Ki-67), клеток макрофагального ряда (ED1 подобный антиген), клеточной активации (CD25), клеточной дифференцировки CD34, а также компонентов основного вещества и волокон соединительной ткани (фибронектина, агреккана, матрилина-2, фибулина-2 и коллагена I и II типов) (табл. 2) проводили с помощью непрямого стрептавидин-биотинового пероксидазного метода.

Таблица 2 – Общая характеристика первичных антител для изучения матрикс-продуцирующих клеток и их микроокружения

Маркеры	Характеристика и фирмы-производители
Bcl-2	Anti-Bcl-2 (Isotype: Mouse IgG1, Clone: 7; Reactivity: human, dog, rat , mouse; BD Biosciences)
Bax	Anti-Bax (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse/Rat; Reactivity: rat , mouse; BD Biosciences)
Bad	Anti-Bad (Isotype: Mouse IgG2b, Clone 48; Reactivity: human, rat , mouse; BD Biosciences)
p53	Anti-p53 (Novocastra NCL-p53-CM5p, Isotype: Mouse IgG; Reactivity: rat , mouse)
Ki-67	Anti-Ki-67 (RTU-Ki67-MM1, Isotype: Mouse; Reactivity: human, rat , mouse; Novocastra)
CD25	Anti-CD25(IL-2R α chain; Isotype: Mouse IgG1, κ ; клон OX-39; Reactivity: rat ; BD Biosciences)
Mononuclear Phagocyte	Anti-Mononuclear Phagocyte-Biotin (Clone: 1C7, Isotype: Mouse IgG1; Reactivity: rat ; BD Biosciences)
CD34	Anti-CD34 (Isotype: mouse monoclonal IgG1; Clone:ICO115; Reactivity: human, rat ; SANTA CRUZ INC)
Fibronectin	Anti-Fibronectin (Isotype: Mouse IgG1, Clone: IST-9, Reactivity: human, rat , mouse; SANTA CRUZ INC)
Matrilin-2	Anti-Matrilin-2 (H-65, rabbit polyclonal; Reactivity: human, rat , mouse; SANTA CRUZ INC)
Fibulin-2	Anti-Fibulin-2 (H-250, rabbit polyclonal; Reactivity: human, rat , mouse; SANTA CRUZ INC)
Collagen Type I	Anti-Collagen Type I (COL-1, Mouse IgG; Reactivity: human, rat ; SANTA CRUZ INC)
Collagen 2A1	Anti-COL2A1 (M2139, mouse IgG2; Reactivity: human, rat , mouse; SANTA CRUZ INC)

В работе использовали систему визуализации Peroxidase Detection System

(Novocastra). После процедуры демаскировки иммуногистохимическую окраску препаратов проводили в соответствии с общепринятыми стандартами указанной методики (Bibeau F. et al., 2006; Ramos-Vara J.A., 2005) и в соответствии с рекомендациями фирм-производителей.

Морфометрический анализ. Анализ интенсивности окрашивания выявляемых компонентов соединительной ткани и площади проводили с помощью морфометрического комплекса на базе микроскопа Micros MC 300A, цифровой камеры CX 13c (фирма Baumer Optronik GmbH, Германия) и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США). Для каждого животного оценивали по 8 изображений, площадь каждого составляла 21455 мкм².

Определяли площадь изучаемых компартментов ($s_{обл}$), среднее серое значение их яркости ($r_{обл}$), а также среднее серое значение яркости фона ($r_{фона}$). Затем вычисляли: 1) интенсивность окраски фона ($io_{фона}$) по формуле:

$$io_{фона} = 255 - r_{фона};$$

2) интенсивность окраски области, занимаемой выявляемыми компонентами ($io_{обл}$), по формуле:

$$io_{обл} = 255 - r_{обл} - io_{фона};$$

3) относительную площадь $s_{обл. отн}$ по формуле:

$$s_{обл. отн} = s_{обл} \times 100 / 21455,3328;$$

3) относительное содержание компонентов внеклеточного матрикса (с) по формуле:

$$c = s_{обл. отн} \times io_{обл}$$

Исследование маркеров межклеточных взаимодействий – про- и противовоспалительных цитокинов и ростовых факторов. Исследование цитокинового профиля (IL-1 β , IL-1 RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, IL-22, TNF- α , INF- γ , TGF- β , FGFb) проводили наборами реагентов для иммуноферментного определения концентрации в сыворотке крови с использованием Wellwasf 4 Mk2 и спектрофотометра Multiscan Spectrum фирмы Thermo scientific (Finland).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета для статистической обработки SPSS v 13.0 for Windows. Для сравнения независимых групп использовали критерий Крускала–Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью критерия Манна–Уитни. Различия между значениями сравниваемых параметров расценивали как статистически значимые при $p < 0,05$. Полученные в ходе исследования данные представлены как средняя (M) $\pm$ стандартная ошибка средней (m). С целью выявления

наиболее информативного комплекса признаков проведен корреляционный анализ с вычислением непараметрического коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Волокнистый хрящ. При светооптическом изучении фиброзных колец межпозвонковых дисков отмечен полиморфизм хондроцитов: неодинаковое сродство ядер к красителям, деформация и пикноз ядер отдельных клеточных элементов, что подтверждалось результатами электронно-микроскопического исследования, при котором отмечено появление клеточных элементов с признаками коагуляционного некроза при повышенной биосинтетической активности сохранившихся хондробластов. В дальнейшем появлялись участки, лишенные сульфатированных гликозаминогликанов, при ультраструктурном изучении – возрастание осмеофилии основного вещества, очаговая конденсация протеогликанов.

Динамика изменений внеклеточного матрикса фиброзных колец межпозвонковых дисков у животных с инокуляцией *Staphylococcus aureus* характеризовалась нарастанием дистрофически-дегенеративного процесса (табл. 3; рис. 1). Нарушение светового режима провоцировало более выраженные изменения компонентов внеклеточного матрикса, которые частично нивелировались в восстановительном периоде (относительное содержание коллагеновых волокон и соотношение относительных площадей, занимаемых коллагенами I и II типа не отличались от животных, содержащихся при естественном режиме освещения). Применение мелатонина у животных с наличием очага стафилококковой инфекции способствовало предотвращению проявлений вторичной системной дезорганизации соединительной ткани. Непосредственно после окончания курса светотерапии не наблюдалось положительной реакции со стороны внеклеточного матрикса. Однако наблюдение в динамике позволило выявить достоверную положительную тенденцию – замедление снижения содержания сульфатированных гликозаминогликанов и коллагеновых волокон.

При исследовании пульпозных ядер межпозвонковых дисков у животных с инокуляцией *Staphylococcus aureus* в динамике эксперимента отмечалось увеличение нейтральных гликопротеинов, с одновременным снижением сульфатированных гликозаминогликанов, а также изменение соотношения основных коллагенов с появлением обширных лакун, лишенных клеточных элементов и заполненных коллагеном II типа. В нотохордальных клетках часто отмечалась периферическая локализация ядра; в некоторых случаях наблюдалась дезинтеграция с соседними клетками, а также дегенерация нотохордальных клеток с кариопикнозом.

Таблица 3 – Морфометрическое исследование компонентов внеклеточного матрикса фиброзных колец межпозвонковых дисков в динамике стафилококковой инфекции ($M \pm m$)

Показатель		Интактные	Инокуляция <i>St. aureus</i>		
			1 месяц	2 месяца	3 месяца
Фиброзные кольца межпозвонковых дисков	Коллагеновые волокна I типа:				
	Относительная площадь (%)	80,09 ± 0,63	84,12 ± 0,74*	88,16 ± 0,54*	76,79 ± 1,65
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	28,38 ± 1,34	26,63 ± 1,57	7,84 ± 0,49*	22,48 ± 1,33*
	Относительное содержание (у.е.)	2264,5±103,1	2230,0±131,9	690,7±43,6*	1663,6±83,6*
	Коллагеновые волокна II типа:				
	Относительная площадь (%)	89,32±1,24	67,10±0,83*	65,26±0,99*	77,34±0,80*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	8,69±0,88	50,70±0,67*	54,57±0,88*	51,27±0,57*
	Относительное содержание (у.е.)	788,1 ±82,8	3399,0±58,8*	3547,9±65,7*	3976,8±72,8*
	Фибронектин:				
	Относительная площадь (%)	73,11±0,81	78,70±0,69*	72,24±0,90	65,56±0,81*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	38,09±1,52	42,13±1,37	17,18±0,75*	17,03±1,27*
	Относительное содержание (у.е.)	2805,6±127,0	3298,9±102,4*	1247,2±58,5*	1130,1±85,4*
	Фибулин 2:				
	Относительная площадь (%)	67,02±1,11	67,75±1,11	83,22±0,92*	82,20±1,08*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	21,60±1,14	34,06±1,14	54,63±1,61*	77,34±1,41*
	Относительное содержание (у.е.)	1442,0 ± 80,5	2301,9±85,0*	4522,6±131,3*	6373,3±164,3*
	Матрилин 2				
	Относительная площадь (%)	56,28 ± 2,36	68,29 ± 0,63*	69,75 ± 0,84*	63,69 ± 1,47*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	9,54 ± 1,28	9,99±0,22	11,23±0,13*	26,20 ± 1,57*
	Относительное содержание (у.е.)	437,4 ± 51,8	681,4 ± 15,6*	782,5±11,2*	1664,5±106,8*

Примечание: * – статистически значимые различия с интактными животными при 95 % уровне значимости ($p < 0,05$)

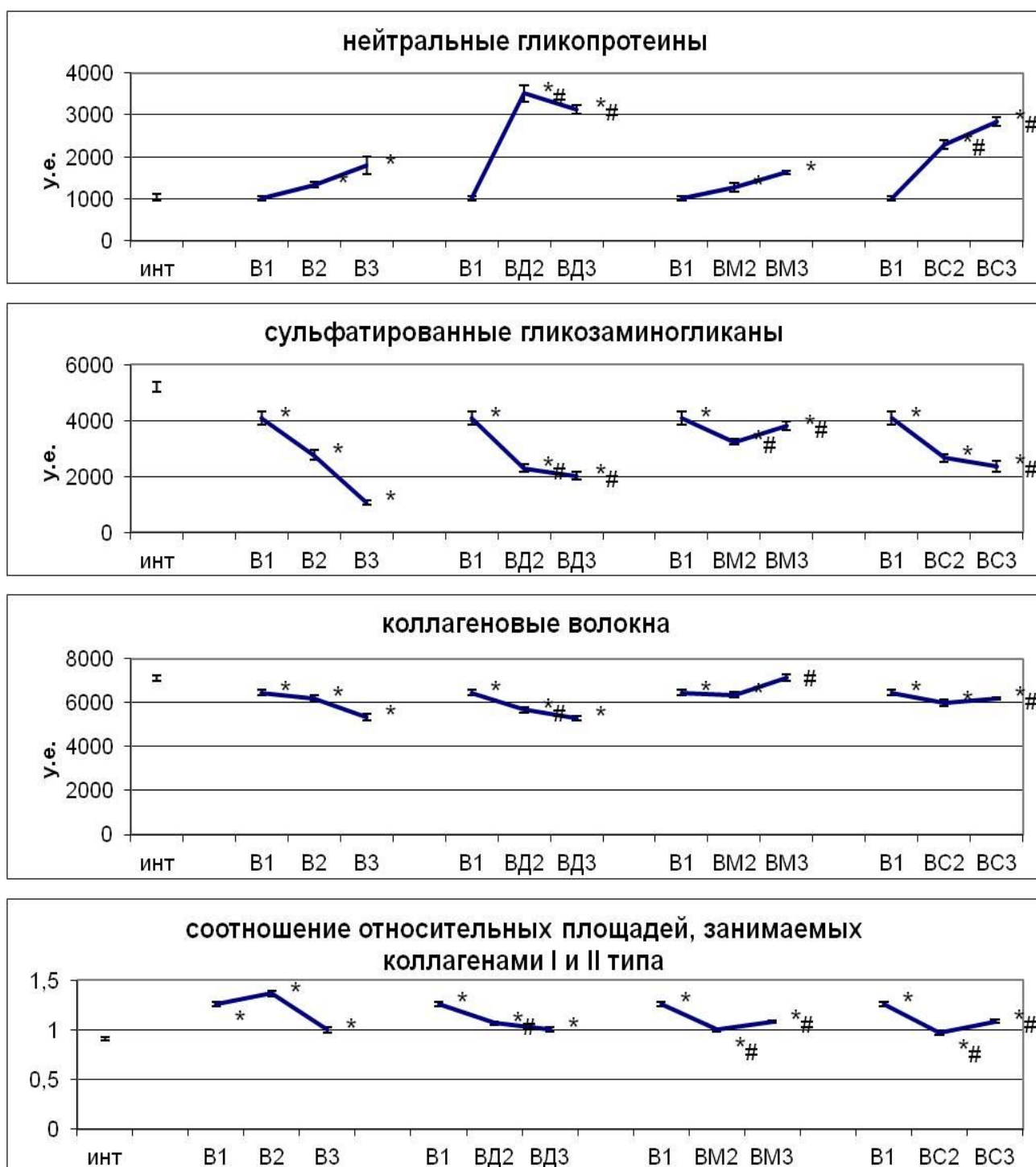


Рис. 1. Динамика относительного содержания компонентов внеклеточного матрикса в фиброзном кольце межпозвонковых дисков при инокуляции *St. aureus*, различных режимах освещения и корригирующих воздействиях

Морфометрический анализ компонентов внеклеточного матрикса пульпозного ядра межпозвонковых дисков продемонстрировал прогрессирующее нарастание в них патологических изменений (табл. 4; рис. 2).

Таблица 4 – Морфометрическое исследование компонентов внеклеточного матрикса пульпозных ядер межпозвонковых дисков в динамике стафилококковой инфекции ($M \pm m$)

Показатель		Интактные	Инокуляция St. aureus		
			1 месяц	2 месяца	3 месяца
Пульпозные ядра межпозвонковых дисков	Коллагеновые волокна I типа:				
	Относительная площадь (%)	23,24±1,28	23,17±1,38	23,95±1,00	39,99±1,30*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	87,78±1,60	48,68±1,79*	40,54±2,05*	65,79±1,68*
	Относительное содержание (у.е.)	1982,8 ± 93,1	1054,8±51,8*	956,9 ± 59,7*	2598,6 ± 88,7*
	Коллагеновые волокна II типа:				
	Относительная площадь (%)	5,44±0,38	20,97±1,39*	39,34±0,54*	45,53±2,08*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	32,57±1,13	36,84±1,69*	47,46±1,45*	65,80±1,12*
	Относительное содержание (у.е.)	172,3 ± 11,8	734,5 ± 54,1*	1864,3±59,3*	2965,7±133,9*
	Фибронектин:				
	Относительная площадь (%)	3,44±0,09	3,53±0,08	3,98±0,05*	4,25±0,04*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	56,94±1,16	58,36±1,08	35,69±1,59*	33,75±1,36*
	Относительное содержание (у.е.)	194,6±5,6	205,9±6,0	142,4±6,6*	143,5±5,9*
	Фибулин 2:				
	Относительная площадь (%)	3,44±0,10	36,47±0,93*	31,36±0,95*	31,42±0,81*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	34,33±0,99	27,22±1,00*	73,34±1,68*	94,86±1,33*
	Относительное содержание (у.е.)	116,8 ± 4,6	974,4 ± 35,4*	2290,1±79,6*	2957,9±67,8*
	Матрилин 2				
	Относительная площадь (%)	3,74 ± 0,11	4,34 ± 0,13*	4,06 ± 0,08*	4,26 ± 0,13*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	22,91 ± 1,16	19,79 ± 1,19*	21,95 ± 0,88	27,51 ± 1,39*
	Относительное содержание (у.е.)	84,6 ± 4,36	87,1 ± 6,0	88,0 ± 3,2	113,2 ± 5,4*

Примечания: * – статистически значимые различия с интактными животными при 95 % уровне значимости ($p < 0,05$)

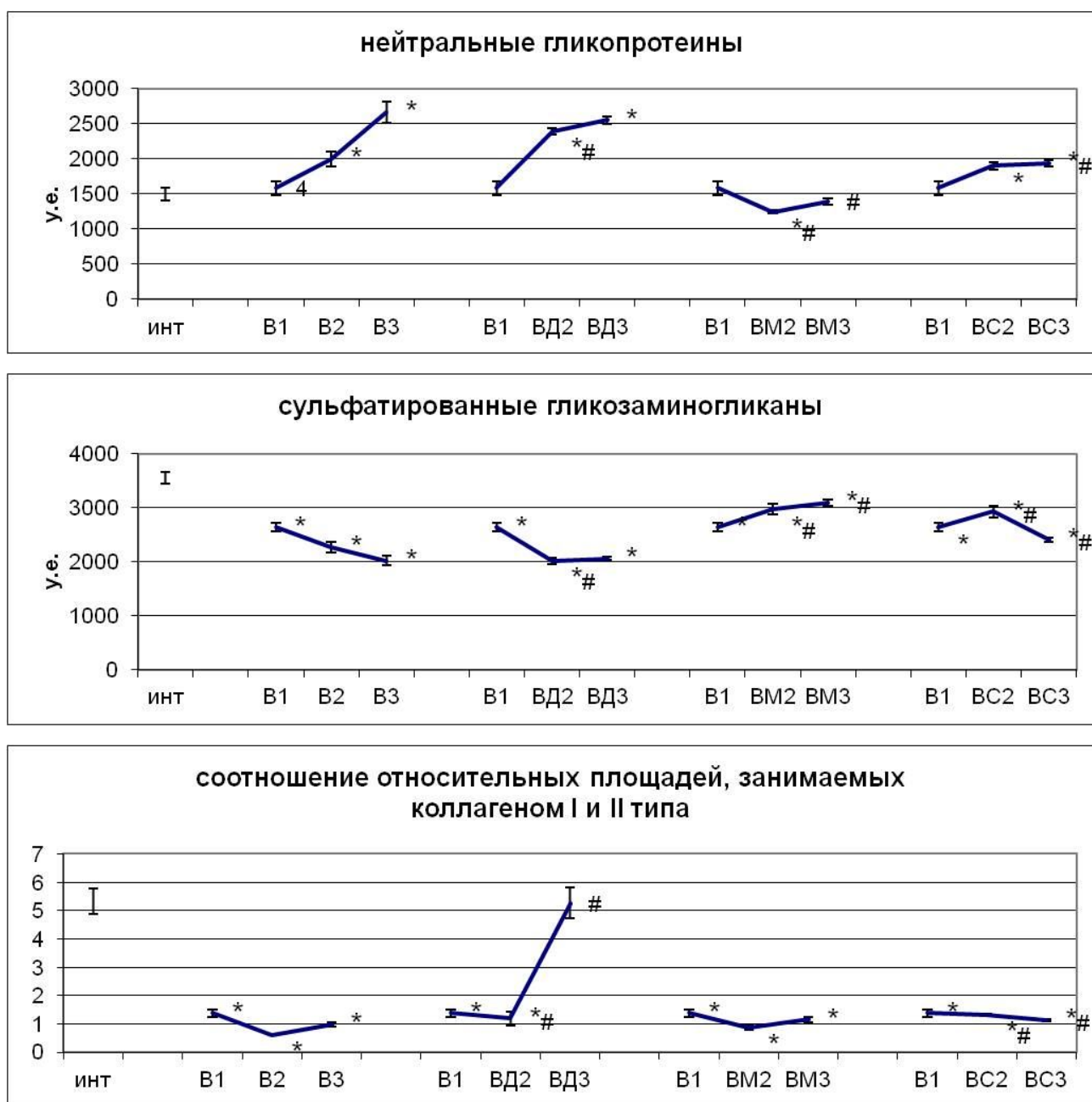


Рис. 2. Динамика относительного содержания компонентов внеклеточного матрикса в пульпозном ядре межпозвоновых дисков у животных с инокуляцией *St. aureus* при различных режимах освещения и корригирующих воздействий

При дополнительном нарушении светового режима у животных с инокуляцией *Staphylococcus aureus* наблюдаются более выраженные изменения компонентов внеклеточного матрикса. Применение мелатонина у животных с наличием очага стафилококковой инфекции препятствовало нарастанию нейтральных гликопротеинов и снижению сульфатированных гликозаминогликанов и не повлияло на соотношение коллагенов I и II типов. Проведенный курс светотерапии способствовал кратковременной (в течение 1 мес.) задержке снижения содержания сульфатированных гликозаминогликанов.

Плотная волокнистая неоформленная соединительная ткань. При морфологическом изучении кожи в динамике эксперимента отмечено нарушение компактного расположения коллагеновых волокон, к которому в последующем присоединялось изменение соотношения коллагенов I и II типов и резкое снижение сульфатированных гликозаминогликанов.

Морфометрический анализ компонентов внеклеточного матрикса сетчатого слоя кожи у животных с инокуляцией *Staphylococcus aureus* выявил прогрессирующее нарастание патологических изменений (рис. 3; табл. 5).

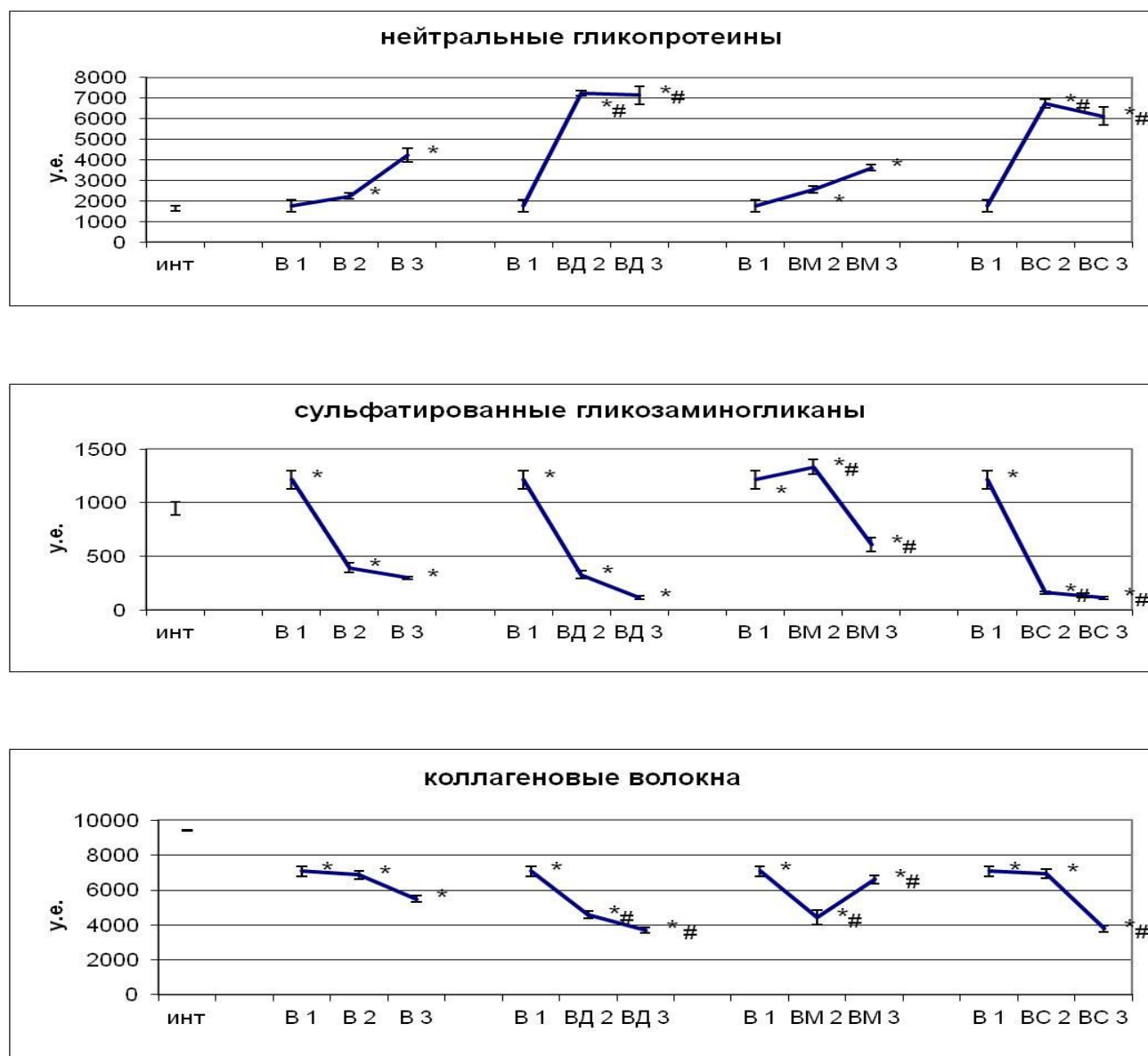


Рис. 3. Динамика относительного содержания компонентов внеклеточного матрикса в сетчатом слое дермы у животных с инокуляцией *St. aureus* при различных режимах освещения и корригирующих воздействий

Таблица 5 – Морфометрическое исследование компонентов внеклеточного матрикса сетчатого слоя кожи в динамике стафилококковой инфекции ($M \pm m$)

Показатель		Интактные	Инокуляция St. aureus		
			1 месяц	2 месяца	3 месяца
Сетчатый слой кожи	Коллагеновые волокна I типа:				
	Относительная площадь (%)	40,33± 2,38	77,31± 0,89*	71,09± 0,98*	59,60± 2,34*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	60,10± 1,65	59,47± 2,74	81,53± 2,15*	46,72± 1,85*
	Относительное содержание (у. е.)	2446,1±156,1	4559,5±205,7*	5748,2±134,7*	2798,3±170,1
	Коллагеновые волокна II типа:				
	Относительная площадь (%)	72,57± 0,83	67,04± 0,75*	70,48± 0,83*	65,15±0,56*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	71,07± 1,54	44,08± 1,35*	49,19± 1,64*	50,69± 1,98*
	Относительное содержание (у. е.)	5150,1±121,9	2941,5±88,8*	3436,9±105,2*	3303,0±131,2*
	Фибронектин:				
	Относительная площадь (%)	84,15± 0,75	68,56± 0,88*	69,71± 0,51*	69,44± 0,58*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	37,82±1,47	66,38± 1,72*	79,61± 1,53*	36,59± 2,02
	Относительное содержание (у. е.)	3159,2±111,7	4518,8±109,0*	5543,6±106,8*	2519,4±133,2*
	Фибулин 2:				
	Относительная площадь (%)	65,57±1,72	58,28± 1,77*	61,56± 1,73	60,55± 1,90
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	69,92± 2,65	41,56± 1,34*	68,44± 1,39	54,00± 1,48
	Относительное содержание (у. е.)	4471,3±178,8	2364,6±80,4*	4163,4±117,5*	3209,9±105,2*
	Матрилин 2				
	Относительная площадь (%)	48,80± 1,99	53,20± 2,03	55,52± 1,36*	79,14± 0,61*
	Интенсивность окрашивания (у. е.)	76,43± 1,77	53,05± 1,55*	67,81± 1,05*	42,22±1,02*
	Относительное содержание (у. е.)	3614,5±113,0	2711,7±76,6*	3725,1±75,3	3332,0±76,2

Примечание: * – статистически значимые различия с интактными животными при 95 % уровне значимости ($p < 0,05$)

Нарушение светового режима усилило наблюдаемую тенденцию. Применение мелатонина препятствовало снижению сульфатированных гликозаминогликанов, а в отдаленном периоде и коллагена. Под влиянием светотерапии, на фоне имеющегося

очага стафилококковой инфекции, изменения внеклеточного матрикса сетчатого слоя дермы стали более выраженными.

При морфометрическом анализе фибробластов сетчатого слоя дермы отмечено усиление инициации митохондриального пути апоптоза при уменьшении пролиферативной способности данных клеточных элементов (рис. 4; 5).

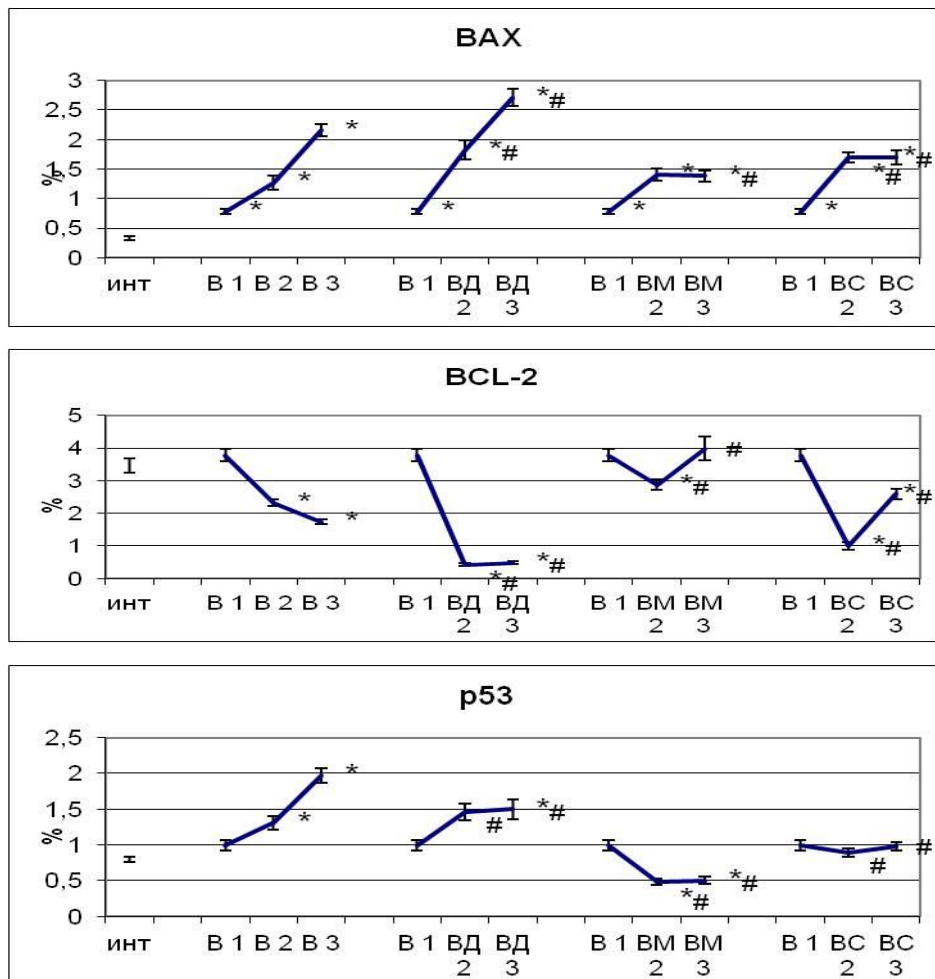


Рис. 4. Динамика относительной площади клеточных элементов, экспрессирующих белки-регуляторы апоптоза, в сетчатом слое дермы у животных с инокуляцией *St. aureus* при различных режимах освещения и корригирующих воздействий

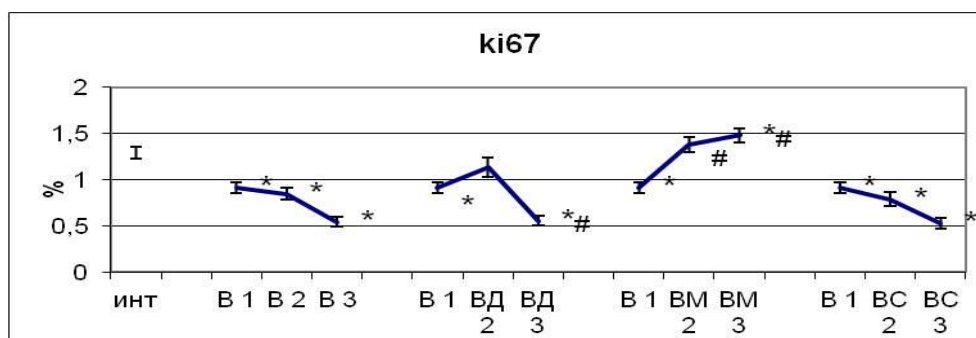


Рис. 5. Динамика относительной площади клеточных элементов, экспрессирующих маркер пролиферации Ki-67, в сетчатом слое дермы при инокуляции *St. aureus* при различных режимах освещения и корригирующих воздействий

Круглосуточное освещение индуцировало более выраженную продукцию проапоптотических белков на фоне снижения пула клеточных элементов, экспрессирующих антиапоптотический белок Bcl-2, у крыс, по сравнению с животными, содержащимися при естественном режиме освещения. Применение мелатонина способствовало уменьшению процессов инициации и пролонгации апоптоза, а также восстановлению пролиферативной активности фибробластов. Проведенный курс светотерапии обуславливал более выраженные изменения экспрессии белков, участвующих в инициации апоптоза, хотя популяция фибробластов, экспрессирующих p53, не изменилась по сравнению с интактными животными.

Рыхлая волокнистая неоформленная соединительная ткань. В печени в динамике эксперимента у животных с инокуляции *Staphylococcus aureus* отмечался полиморфизм и дистрофия гепатоцитов, расширение синусоидных капилляров, инфильтрация портальных трактов мононуклеарными клетками. Через 2 мес. повышалось количество тучных клеток в области портальных трактов, увеличивалось количество портальных клеточных элементов, экспрессирующих белок Ki67, что через 3 мес. привело к выраженным фиброзным изменениям как в области триад, так и окружении центральных вен.

При изучении экспрессии белков-регуляторов апоптоза отмечено увеличение гепатоцитов и синусоидальных клеток, экспрессирующих белок Вах, уменьшение экспрессии белка Bcl-2, а также увеличение гепатоцитов и синусоидальных клеток, экспрессирующих белок p53.

Популяция липидосодержащих звездчатых клеток возросла в 2,5 раза, с синхронным увеличением популяции тучных клеток и повышенной пролиферативной активностью фибробластов, что позволяет предположить, что наряду с классическим вариантом развития фиброза, реализующимся вследствие активации макрофагами звездчатых клеток печени, включается альтернативный механизм – фиброгенная активация фибробластов портальных трактов тучными клетками.

Морфометрический анализ компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани стромы печени продемонстрировал нарастание фиброзных изменений. При нарушении светового режима наблюдалось усиление фиброза печени. Применение мелатонина у животных с наличием очага стафилококковой инфекции препятствовало увеличению количества коллагеновых волокон в области триад и способствовало нормализации содержания коллагеновых волокон и сульфатированных гликозаминогликанов в стенках и окружении центральных вен. При общем воздействии монохромным синим светом уменьшалась выраженность

фиброзных изменений печени.

Отмеченные выше изменения матрикс-продуцирующих клеток и их микроокружения при инокуляции *Staphylococcus aureus* сопровождались изменениями исследованного спектра цитокинов: через 2 месяца достоверно повышается уровень IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-22, INF- γ , IL-1RA, IL-4, IL-10, TGF- β 1, FGFb; через 3 месяца – IL-2, IL-12, IL-17, IL-18, IL-22, INF- γ , IL-1RA, IL-4, IL-10, FGFb. При проведении корреляционного анализа выявлен ряд цитокинов, имеющих наибольшее значение при формировании вторичной системной дезорганизации соединительной ткани: IL-1RA, IL-4, IFN- γ , IL-17, IL-6, TGF- β 1.

Результаты комплексного структурно-функционального исследования позволили сформулировать концепцию развития вторичной системной дезорганизации соединительной ткани при наличии очага стафилококковой инфекции (рис. 6).



Рис. 6. Формирование вторичной системной дезорганизации соединительной ткани при наличии очага хронической бактериальной инфекции

Круглосуточное освещение приводит к выраженному рассогласованию биоритмов организма, в частности, иммунной системы (Труфакин В.А. и др., 1991; Шурлыгина А.В., Труфакин В.А., 1993; Литвиненко Г.И. с соавт., 2005), что сопровождается продемонстрированными в эксперименте изменениями цитокинового спектра и способствует развитию дистрофически-дегенеративных изменений, а также фиброгенеза.

«Клетками-мишенями» для мелатонина, обладающего антиоксидантными свойствами, при развитии вторичной системной дезорганизации соединительной ткани являются матрикс-продуцирующие клетки брэдитрофной (волокнистый хрящ) и относительно брэдитрофной (плотная волокнистая неоформленная соединительная ткань) тканей, а также тучные клетки, способствующие усилению синтеза волокнистого компонента и пролиферативной активности фибробластов (Berton A. et al., 2000; Garbuzenko E. et al., 2002, 2004) в нормотрофных тканях (рыхлая волокнистая неоформленная соединительная ткань паренхиматозных органов).

Общее воздействие монохромным синим светом улучшает центральную гемодинамику и микроциркуляцию (Карандашов В.И. и др., 2004, 2009), оказывает положительное влияние, прежде всего, на нормотрофные ткани, препятствуя развитию неспецифических реактивных воспалительных процессов в паренхиматозных органах.

ВЫВОДЫ

1. При инокуляции *Staphylococcus aureus* в большеберцовую кость в межпозвонковых дисках выявлены прогрессирующее снижение сульфатированных гликозаминогликанов и достоверное увеличение нейтральных гликопротеинов в сочетании с изменениями количественно-качественных параметров коллагеновых волокон; дегенеративные изменения большинства матрикс-продуцирующих клеток с доминированием проявлений парциальной аутофагии и снижением биосинтетических процессов, а также компенсаторной реакцией в виде индукции внутриклеточных регенераторных процессов в остальной популяции резидентных клеток и рекрутирования перicytот на фоне усиления кровоснабжения в наружных отделах фиброзных колец в динамике эксперимента.

2. Создание очага стафилококковой инфекции в большеберцовой кости приводит к инициации и пролонгированию проапоптотических изменений клеточных элементов сетчатого слоя дермы в сочетании со снижением их пролиферативной способности; резкому снижению сульфатированных гликозаминогликанов в сетчатом слое дермы; нарушению компактного расположения, уменьшению относительного содержания и изменению соотношения основных типов коллагеновых волокон;

увеличению содержания нейтральных гликопротеинов при изменении соотношения их фракций.

3. При моделировании стафилококковой инфекции наряду с классическим вариантом развития фиброза печени, реализующимся вследствие фиброгенной активации звездчатых клеток, индуцируется альтернативный механизм – активация фибробластов портальных трактов тучными клетками.

4. Круглосуточное освещение в условиях хронического течения стафилококковой инфекции способствует развитию более выраженных проявлений вторичной системной дезорганизации соединительной ткани по сравнению с обычными условиями освещения: снижение содержания сульфатированных гликозаминогликанов и коллагена, а также повышение нейтральных гликопротеинов в межпозвонковых дисках и сетчатом слое дермы; усиление экспрессии *Wα* при одновременном снижении экспрессии *Bcl-2* в фибробластах кожи; усиление фиброза печени.

5. Применение мелатонина в дозе 1 мг/кг веса у животных при моделировании вторичной системной дезорганизации соединительной ткани способствует: уменьшению дистрофически-дегенеративных изменений в фиброзных кольцах и пульпозных ядрах межпозвонковых дисков, развитию компенсаторных реакций с усилением ангиогенеза в наружном отделе фиброзного кольца и увеличением количества двуядерных нотохордальных клеток.

6. Использование мелатонина у животных при моделировании вторичной системной дезорганизации соединительной ткани ведет к снижению индуцирующего проапоптотического влияния, а также компенсаторному возрастанию пролиферативной активности фибробластов; возрастанию метаболической активности клеточных элементов сетчатого слоя дермы.

7. Применение мелатонина у крыс при моделировании вторичной системной дезорганизации соединительной ткани способствует предотвращению поражения печени в виде дисциркуляторных нарушений, дистрофии гепатоцитов, разрастания соединительной ткани, склерозирования сосудов печеночных вен.

8. Общее воздействие монохромным синим светом у животных с моделированием вторичной системной дезорганизации соединительной ткани приводит к уменьшению активности неспецифического реактивного гепатита и признаков фиброза печени;

9. При хронической стафилококковой инфекции наблюдается выраженное нарушение цитокинового баланса: через 2 месяца после инокуляции *St. aureus* достоверно повышается уровень *IL-1β*, *IL-6*, *IL-17*, *IL-22*, *INF-γ*, *IL-1RA*, *IL-4*, *IL-10*,

TGF- β 1, FGFb; через 3 месяца - IL-2, IL-12, IL-17, IL-18, IL-22, INF- γ , IL-1RA, IL-4, IL-10, FGFb. Наибольшее значение при формировании вторичной системной дезорганизации соединительной ткани имеют следующие цитокины: IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-17, IL-1RA и TGF- β 1.

10. При моделировании стафилококковой инфекции выявлено два основных типа стратегии структурно-функционального реагирования разных типов соединительной ткани: преимущественно дистрофически-дегенеративное (волокнистый хрящ, плотная волокнистая неоформленная соединительная ткань) и с развитием преимущественно фиброзных изменений (рыхлая волокнистая неоформленная соединительная ткань).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Команденко Н.И. Остеохондроз позвоночника: **монография** / Н.И. Команденко, А.И. Рыжов, **И.П. Жураковский**. - Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2006.- 246 с.

2. **Жураковский И.П.** Особенности реагирования тканевого микрорайона печени при наличии отдаленного очага хронической инфекции в условиях светового десинхроноза / **И.П. Жураковский**, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц / В кн. Адаптация человека к экологическим и социальным условиям Севера : **монография** / Отв. ред. Е.Р. Бойко.- Сыктывкар – УрО РАН, 2012.- С.285-290.

3. **Жураковский И.П.** Вторичная системная дезорганизация соединительной ткани как одно из проявлений синдрома сочетанных дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных : **монография** / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, М.Г. Пустоветова.- LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012.- 168 с.

4. **Жураковский И.П.** Экспериментальная модель остеохондроза позвоночника / Н.И. Команденко, А.И. Рыжов, **И.П. Жураковский** // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**.- 1998.- Т. 125, № 6.- С. 706-708.

5. **Жураковский И.П.** Патоморфологические изменения гиалинового хряща при воздействии фокальной персистирующей инфекции / **И.П. Жураковский**, А.И. Рыжов, Н.И. Команденко // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**.- 2002.- Т. 134, № 10.- С. 477-480.

6. **Жураковский И.П.** Антифибротический эффект мелатонина при формировании синдрома сочетанных дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова // **Сибирское медицинское обозрение**.- 2011.- Т. 69. № 3.- С. 30-34.

7. Активация митохондриального пути апоптоза гепатоцитов при

персистенции бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // **Забайкальский медицинский вестник (электронный журнал)**.- 2011.- № 2.- С. 125-131.- Режим доступа: <http://chitgma.ru/zmv2/journal/2011-2/21.pdf>.

8. Особенности распределения хондроитинсульфатов и коллагена в области триад и центральных вен в зависимости от морфологических изменений в печени при персистенции бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // **Кубанский научный медицинский вестник**.- 2011.- № 4.- С. 79-83.

9. Особенности развития фиброза печени на фоне формирования синдрома дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // **Сибирский медицинский журнал (г. Томск)**.- 2011.- Т. 26. № 3-2.- С. 140-143.

10. Состояние тканевого микрорайона печени в восстановительном периоде после травматического повреждения большеберцовой кости / **И.П. Жураковский**, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева // **Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»**.- 2011.- № 4.- С. 34-38.

11. Влияние монохромного синего света на морфологию печени и экспрессию маркеров пролиферации и моноклеарных фагоцитов при наличии отдаленного очага хронического воспаления / И.О. Маринкин, **И.П. Жураковский**, М.Г. Пустоветова, С.А. Архипов, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева // **Сибирское медицинское обозрение**.- 2012.- Т. 74, № 2.- С. 15-19.

12. Изменения экспрессии белков семейства Bcl-2 в печени крыс и уровень цитокинов в сыворотке крови при персистенции бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, И.О. Маринкин // **Кубанский научный медицинский вестник**.- 2012.- № 2.- С. 84-88.

13. Система моноклеарных фагоцитов печени и цитокины сыворотки крови при персистенции бактериальной инфекции на фоне светового десинхроноза / И.О. Маринкин, **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова // **Медицина и образование в Сибири (электронный журнал)**. – 2012. – № 5. – Режим доступа: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=793.

14. Экспрессия белков Bcl-2 и Bad в печени крыс и уровень цитокинов сыворотки крови при персистенции бактериальной инфекции на фоне круглосуточного освещения / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева,

С.А. Архипов, Т.А. Кунц, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // **Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.**- 2012.- № 4.- С. 71-73.

15. Особенности активации макрофагов печени при персистенции бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, С.А. Архипов, Т.А. Кунц, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // **Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.**- 2012.- Т. 10, № 4.- С. 60-65.

16. Влияние нарушений цитокинового баланса на морфологию межпозвоночных дисков / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, С.А. Архипов, Т.А. Кунц, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // **Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.**- 2013.- Т. 11, № 1.- С. 236-242.

17. Экспрессия белков семейства Bcl-2 и белка p53 в фибробластах кожи при длительном течении стафилококковой инфекции / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // **Медицина и образование в Сибири (электронный журнал).** – 2013. – № 2. – Режим доступа: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=960.

18. **Жураковский И.П.** Морфологические изменения тканевого микрорайона печени при моделировании фокальной персистирующей инфекции / **И.П. Жураковский**, С.В. Мичурина // **Морфология.**- 2008.- № 3.- С.44.

19. Продукция белков семейства Bcl-2 в печени крыс Wistar при фокальной персистирующей инфекции / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // **Аллергология и иммунология.**- 2011.- Т. 12, № 3.- С. 278.

20. Экспрессия маркеров и p53 в печени крыс Wistar при персистенции бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // **Аллергология и иммунология.**- 2011.- Т. 12, № 3.- С. 279.

21. **Жураковский И.П.** Особенности морфологических изменений в печени на фоне системной реакции соединительной ткани, обусловленной наличием очага хронической бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, А.И. Рыжов // **Проблемы гастроэнтерологии : материалы Всесоюзной научно-практической конференции.** - Саратов, 2002. - С.31-33.

22. **Жураковский И.П.** Морфология гиалинового и волокнистого хряща при воздействии хронической очаговой бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**,

А.И. Рыжов // Проблемы саногенного и патогенного эффектов экологического воздействия на внутреннюю среду организма : материалы VI Международного научного симпозиума, VII Чуйской научно-практической конференции.- Чолпон-Ата, 2003.- Т. II.- С.225-229.

23. **Жураковский И.П.** Характер и динамика морфологических изменений в печени при воздействии хронической очаговой инфекции / **И.П. Жураковский** // Медицина и образование в XXI веке материалы Ежегодной научно-практической конференции с международным участием.- Новосибирск, 2004.- С.60-61.

24. **Жураковский И.П.** Особенности системных дегенеративно-дистрофических изменений разных типов хрящевой ткани при хроническом бактериальном воспалительном процессе / **И.П. Жураковский**, С.В. Мичурина // Проблемы лимфологии и интерстициального массопереноса : материалы научной конференции с международным участием, посвященной 75-летию со дня рождения и 50-летию научно-педагогической деятельности академика РАМН Ю.И. Бородина.- Новосибирск, 2004.- Т.Х, часть 1.- С.172-176.

25. **Жураковский И.П.** Влияние фокальной персистирующей инфекции на некоторые структурные элементы тканевого микрорайона разных типов соединительной ткани / **И.П. Жураковский**, С.В. Мичурина // Клинико-морфологические аспекты общепатологических процессов при социально-значимых заболеваниях : материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной памяти проф. М.Я. Субботина.- Новосибирск, 2004.- С.68-71.

26. **Жураковский И.П.** Морфологические параллели между изменениями тканевого микрорайона печени и интерстициального пространства волокнистого хряща и плотной волокнистой соединительной ткани на ранних этапах формирования хронического воспаления / **И.П. Жураковский**, С.В. Мичурина // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии : материалы Международной конференции. Т. 1.- Новосибирск, 2008.- С.133-135.

27. Влияние монохромного синего света на апоптотические процессы в печени при фокальной персистирующей инфекции / И.О. Маринкин, **И.П. Жураковский**, М.Г. Пустоветова, С.А. Архипов, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева // Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении / Материалы IX российско-немецкой научно-практической конференции Форума им. Р.Коха и И.И. Мечникова / Под общей редакцией О.В. Кравченко (Россия), г. Хана (Германия).- Новосибирск: Издательство «Сибирский Центр Деловых Технологий», 2010.- С. 141-143.

28. Возможный альтернативный механизм развития фиброза печени при

синдроме дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // Актуальные вопросы внутренней патологии. Дисплазия соединительной ткани : сборник тезисов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.- Омск, 2011.- С. 7-9.

29. Протективное действие мелатонина при фиброзе печени у крыс-самцов Вистар с моделью вторичной дезорганизации соединительной ткани / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // Актуальные вопросы внутренней патологии. Дисплазия соединительной ткани : сборник тезисов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.- Омск, 2011.- С. 92-94.

30. Экспрессия маркеров пролиферации и мононуклеарных фагоцитов в печени крыс при персистенции бактериальной инфекции в условиях общего воздействия монохромным синим светом / И.О. Маринкин, **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: материалы V Всесоюзной научно-практической конференции/ про ред. акад. РАМН, проф. В.А. Шкурупия.- 2011.- С. 129-130.

31. Применение мелатонина для профилактики поражения печени при формировании синдрома сочетанных дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // Вопросы патогенеза типовых патологических процессов : труды III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.- Новосибирск.- 2011.- С. 90-93.

32. Зависимость экспрессии маркера моноцитов/макрофагов и маркера активации клеток в печени крыс от уровня цитокинов в сыворотке крови при персистенции бактериальной инфекции на фоне круглосуточного освещения / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, И.О. Маринкин // Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве, и образовании 2011 : сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2011.- Т. 38, № 4.- С. 15-18.

33. Зависимость экспрессии белков семейства Bcl-2 в печени крыс от уровня цитокинов в сыворотке крови при персистенции бактериальной инфекции на фоне круглосуточного освещения / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, С.А. Архипов,

М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, И.О. Маринкин // Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве, и образовании 2011 : сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2011.- Т. 38, № 4.- С. 19-22.

34. Зависимость экспрессии маркера моноцитов/макрофагов и маркера активации клеток в печени крыс от уровня цитокинов в сыворотке крови при персистенции бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, И.О. Маринкин // Научные исследования и их практическое применение. Современное состояние и пути развития 2011 : сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2011.- Т. 28.- С.6-9.

35. Зависимость экспрессии белков семейства Bcl-2 в печени крыс от уровня цитокинов в сыворотке крови при персистенции бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, Т.А. Кунц, И.О. Маринкин // Научные исследования и их практическое применение. Современное состояние и пути развития 2011 : сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2011.- Т. 28.- С.9-13.

36. Экспрессия маркера моноцитов/макрофагов и маркера активации клеток в печени крыс при персистенции бактериальной инфекции на фоне круглосуточного светового освещения / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // Вопросы патогенеза типовых патологических процессов: труды IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.- Новосибирск.- 2012.- С. 90-92.

37. Экспрессия белков семейства Bcl-2 в печени крыс при персистенции бактериальной инфекции на фоне светового десинхроноза / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // Вопросы патогенеза типовых патологических процессов: труды IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.- Новосибирск.- 2012.- С.92-94.

38. Влияние мелатонина на экспрессию белков семейства Bcl-2 в печени крыс при хроническом остеомиелите / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.Г. Пустоветова, М.В. Битхаева // Человек и лекарство : сборник материалов (тезисы докладов) XIX Российского национального конгресса.- Москва.- 2012.- С. 375-376.

39. Динамика изменений внеклеточного матрикса межпозвоночных дисков и уровня цитокинов сыворотки крови при персистенции бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // Перспективные инновации в науке, образовании, производстве и транспорте 2012 :

сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2012.- Т. 27, № 2.- С. 76-79.

40. Изменения внеклеточного матрикса сетчатого слоя дермы и уровень цитокинов сыворотки крови при наличии отдаленного очага бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, М.В. Битхаева, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // Перспективные инновации в науке, образовании, производстве и транспорте 2012 : сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2012.- Т. 27, № 2.- С. 80-82.

41. Продукция белков семейства Bcl-2 в фибробластах сетчатого слоя дермы при наличии отдаленного очага хронического воспаления / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.В. Битхаева, Т.А. Кунц, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // Научные исследования и их практическое применение. Современное состояние и пути развития 2012 : сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2012.- Т. 33, № 3.- С. 74-76.

42. Экспрессия маркеров p53, Вах, Ki67 в фибробластах сетчатого слоя дермы при наличии отдаленного очага хронического воспаления / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.В. Битхаева, Т.А. Кунц, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // Научные исследования и их практическое применение. Современное состояние и пути развития 2012 : сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2012.- Т. 33, № 3.- С. 71-73.

43. Экспрессия маркеров p53, Вах, Ki67 в фибробластах сетчатого слоя кожи при оппортунистической стафилококковой инфекции на фоне светового десинхроноза / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, Н.В. Самсонова, О.А. Туралина, Т.А. Кунц, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // Современные проблемы и пути их решения в науке. Транспорт, производство и образование : сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2012.- Т. 43, № 4.- С. 39-42.

44. Продукция белков семейства Bcl-2 в фибробластах сетчатого слоя кожи при оппортунистической стафилококковой инфекции на фоне светового десинхроноза / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, Г.С. Жангирова, К.С. Рязанова, Т.А. Кунц, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // Современные проблемы и пути их решения в науке. Транспорт, производство и образование : сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции.- 2012.- Т. 43, № 4.- С. 42-44.

45. Динамика изменений внеклеточного матрикса межпозвоночных дисков при персистенции бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, В.В. Асташов,

И.А. Голубева, Т.А. Кунц, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // Физиология, медицина, фармакология. Высокие технологии, теория, практика. Т.2: сборник статей IV международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» / под ред. А.П. Кудинова, Б.В. Крылова.- СПб.: Изд-во Политехн. Ун-та.- 2012.- С. 47-50.

46. Экспрессия белков семейства Bcl-2 в фибробластах сетчатого слоя дермы крыс при вторичной системной дезорганизации соединительной ткани, обусловленной персистенцией бактериальной инфекции / **И.П. Жураковский**, В.В. Асташов, И.А. Голубева, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // Профилактическая медицина – 2012: Материалы конференции / Под ред. А.В. Силина.- СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2012.- С. 101-102.

47. Морфологические изменения тканевого микрорайона печени при фокальной персистирующей инфекции в условиях светового десинхроноза / **И.П. Жураковский**, М.Г. Пустоветова, В.В. Асташов, И.А. Голубева, М.В. Битхаева, И.О. Маринкин // Профилактическая медицина – 2012: Материалы конференции / Под ред. А.В. Силина.- СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2012.- С. 95-97.

48. Активация митохондриального пути развития апоптоза в фибробластах сетчатого слоя дермы при моделировании стафилококковой инфекции / **И.П. Жураковский**, С.А. Архипов, М.В. Битхаева, М.Г. Пустоветова, И.О. Маринкин // Фундаментальная наука и технологии – перспективные разработки : материалы международной научно-практической конференции.- Москва, 2013.- С. 62-64.

49. Динамика и характер морфологических изменений при экспериментальном остеохондрозе позвоночника / **И.П. Жураковский**, А.И. Рыжов, Н.И. Команденко, В.Д. Заводовская // Компенсаторно-приспособительные механизмы внутренних органов и головного мозга в норме, патологии и эксперименте : тезисы докладов научно-практической конференции.- Тюмень, 1996.- С.118.

50. **Жураковский И.П.** Морфология межпозвонковых дисков половозрелых кроликов в возрастном аспекте / **И.П. Жураковский**, А.И. Рыжов, Н.И. Команденко // Медико-биологические аспекты нейро-гуморальной регуляции : материалы юбилейной конференции, посвященной 35-летию ЦНИЛ.- Томск, 1997.- С.56-57.

51. **Жураковский И.П.** Моделирование остеохондроза позвоночника с помощью фокальной персистирующей инфекции / Н.И. Команденко, **И.П. Жураковский**, А.И. Рыжов // Актуальные вопросы клинической и военной неврологии : сборник трудов юбилейной научной конференции, посвященной 100-летию клиники нервных болезней имени М.И. Аствацатурова Военно-медицинской академии / под ред. проф. Одинака М.М.- Санкт-Петербург, 1997.- С.133.

52. Пат. № 2138080 РФ Способ моделирования остеохондроза позвоночника / Команденко Н.И., **Жураковский И.П.**, Рыжов А.И. - № 96106587/14; Заявл. 04.04.1996; Оpubл. 20.09.1999.- Бюл. № 26.

53. Пат. № 2307397 РФ Способ моделирования вторичной дезорганизации соединительной ткани / **Жураковский И.П.**, Рыжов А.И., Мичурина С.В. - № 2005110004/14; Заявл. 06.04.2005; Оpubл. 27.09.2007.- Бюл. № 27.

54. Пат. № 2455988 РФ Способ профилактики поражения печени при формировании синдрома сочетанных дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе и средство для его осуществления / Маринкин И.О., **Жураковский И.П.**, М.Г. Пустоветова, Кунц Т.А., Битхаева М.В., Шантурова Т.В. - № 2011100512/15; Заявл. 11.01.2011; Оpubл. 20.07.2012.- Бюл. № 20.