

На правах рукописи

Тхакушинов Ибрагим Аскарбиевич

**ВОЗРАСТНЫЕ И ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ
АУТОФАГИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ОЗДОРОВИТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ
У ЛИЦ РАЗНОЙ МАССЫ**

3.1.33. Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении дополнительного профессионального образования «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Корчажкина Наталья Борисовна

Официальные оппоненты:

Кончугова Татьяна Венедиктовна - доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела физиотерапии и рефлексотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кайсинова Агнесса Сардоевна - доктор медицинских наук, заместитель генерального директора по обязательному медицинскому страхованию Федерального государственного бюджетного учреждения «Северо-Кавказский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научный центр реабилитации инвалидов им. Г.А. Альбрехта» Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации

Защита диссертации состоится: «___» _____ 2023 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.204.03 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского» и на сайте www.med.ru. Адрес: 119991, Москва, Абрикосовский пер., д. 2.

С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» по адресу 119991, г. Москва, ГСП-1, Абрикосовский переулок, дом 2 и на сайте www.med.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

Кандидат медицинских наук, доцент

Михайлова Анна Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Повышение адаптационных возможностей человека как для сохранения здоровья, так и для его восстановления является приоритетной задачей восстановительной медицины (А.Н. Разумов, 2016). Для ее решения необходимо знать и уметь активизировать процессы, ответственные за саногенез. Среди таких процессов можно выделить механизмы аутофагии. В современной научной литературе имеется достаточно большое количество научных исследований, свидетельствующих о том, что для сохранения системного и клеточного гомеостаза необходимо поддерживать на должном уровне процесс аутофагии в клетках (S. Kume, T. Uzu, K. Horiike et al., 2010; H. Liu, A. Javaheri, R.J. Godar et al., 2017; D. Derous, S.E. Mitchell, L. Wang et al., 2017; K.W. Chung, H.Y. Chung, 2019). Процесс аутофагии, направленный на уничтожение ненужных соединений, структур и синтез новых, происходит во всех эукариотических клетках, включая клетки человека (D.J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe, et al., 2016). Многие исследователи склонны считать, что аутофагия способна увеличить продолжительность жизни человека (V.D. Longo et al., 2010-2015; S.E. Wohlgemuth, A.Y. Seo, E. Marzetti et al., 2010; K.W. Chung, D.H. Kim, M.H. Park et al., 2013; D. Derous, S.E. Mitchell, L. Wang et al., 2017; K.W. Chung, H.Y. Chung, 2019).

Большинство исследований касаются патологических состояний у человека (болезни Паркинсона, Альцгеймера и др.) и их молекулярно-генетических механизмов нарушений процесса аутофагии (S.E. Wohlgemuth, A.Y. Seo, E. Marzetti et al., 2010; Y.C. Ning, G.Y. Cai, L. Zhuo et al., 2013; D.J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe et al., 2016; L. Yang, D. Licastro, E. Cava et al., 2016; K.W. Chung, H.Y. Chung, 2019; Wang T., Zhang T., Wang Y., 2022). В экспериментальных и отдельных клинических исследованиях описаны многообразные положительные эффекты при активации аутофагии в организме млекопитающих и человека, на основании которых ученые предлагают использовать аутофагию в лечении миастении, поддержании мышечной массы, регенерации гепатоцитов (Chen W., Chen Y., Liu Y., Wang X., 2022; Liu A-Y., Zhang Q-B., Zhou Y., Wang F., 2022; Byrnes K., Blessinger S., Bailey N. T., Scaife R., Liu G., Khambu B., 2022). Механизмы аутофагии тесно связаны с апоптозом, являющимся одним из главных элементов патогенеза сахарного диабета 2-го типа (Аметов А.С., 2015). Однако исследования характера аутофагии у таких пациентов практически отсутствуют, а имеющиеся преимущественно касаются отдельных видов изолированных клеток и клеточных структур (Снигур Г.Л., Сурин С.С., 2021). Сам процесс аутофагии достаточно сложен, и для его осуществления требуется согласованное действие более 30 генов и соответствующих белков («Genome-wide association studies», 2021). Такая сложная система создает трудности для ее коррекции в случае необходимости.

Разработанность темы

На многочисленных экспериментальных моделях показано благоприятное воздействие аутофагии на гомеостаз клетки и весь организм. С открытием Y. Ohsumi (Y. Ohsumi, 2001, 2014) механизмов аутофагии было установлено (на грибах), что основным триггером аутофагии является уменьшение энергообеспеченности клетки. Эти данные были экстраполированы на человека. В большинстве случаев рекомендации по применению различных ограничительных диет получены в экспериментах на животных (Del Roso A. et al., 2003; Chen D. et al., 2008; Rickenbacher A. et al., 2013; Lu D. L. et al., 2019). К примеру, известен способ повышения активности аутофагии у крыс (M. Alirezaei, C.C. Kembal, C.T. Flynn et al., 2017) посредством ограничения калорийности питания, включая голодание. Авторы обнаружили усиление активности аутофагии в нейронах мозга крыс. Однако эффективность этого метода не подтверждена на людях. В литературе описан способ активации аутофагии в лейкоцитах у человека (F. Pietrocola, Y. Demont, F. Castoldi et al., 2017), при котором полностью ограничивали прием пищи в течение 1-4 суток. Было установлено наличие признаков активации аутофагии только в нейтрофилах. Нарастание

этих признаков фиксировалось уже через 24 часа после начала голодания и продолжалось до конца исследования.

Следует отметить, что при изучении других механизмов и систем установлено положительное влияние самого голодания и ограничения калорийности питания на организм человека и животных (Ю.С. Николаев, Е.И. Нилов, 1973; V.D. Longo et al., 2010-2015; Dorling et al., 2021; Spadaro et al., 2022), и этот факт мало кем подвергается сомнению. В настоящее время распространение получило так называемое «интервальное голодание» (М.В. Алташина, Е.В. Иванникова, Е.А. Трошина, 2022). Параллельно этим методам в восстановительной медицине и реабилитации используется большой арсенал средств и немедикаментозных методов, способствующих восстановлению здоровья. Так, широко используется в восстановительной медицине лазеротерапия (Байбеков И.М. и др., 2019; Болтабаев М.Р. и др., 2021; Денисова У.Ж., 2019; Илларионов В.Е., 2017; Поддубная О.А., 2020; Корчажкина Н.Б., Купеев Р.В., 2021), биорезонансная терапия (Гусинский А.В. и др., 2018; Джиоева А.С. и др., 2022; Каладзе Н.Н., 2020; Кирьянова В.В. и др., 2018; Кирьянова В.В. и др., 2019; Sabioğlu M.T. et al., 2022), массаж мышц (Акопян Л. И др., 2021; Епифанов В.А. и др., 2020; Еремушкин Е.А. и др., 2018; Коршунов О.И. и др., 2020; Юдакова О.Ф. и др., 2020), гидроклоноотерапия (Emmanuel A. et al., 2019; Henderson M. et al., 2018; Vitton V. et al., 2018; Yates A., 2020), нейростимуляция (Дракон А.К., Корчажкина Н.Б., Шелудченко В.М., 2022) и др. Однако детального изучения процесса аутофагии и методов его регуляции у человека при различных схемах проведения оздоровительных мероприятий в сочетании с диетотерапией не проводилось. Не исследованы гендерные, возрастные особенности, а также взаимосвязь активности аутофагии с морфофизиологическими параметрами человека. Все вышеизложенное определило цель настоящего исследования.

Цель исследования. Изучить активность аутофагии под влиянием комплексной оздоровительной программы (КОП) и ограничения калорийности питания в зависимости от гендерных, возрастных и соматоморфологических признаков у пациентов с избыточной массой тела.

Задачи исследования:

1. Оценить «базовую» активность аутофагии у мужчин и женщин с избыточной массой тела и выявить ее взаимосвязь с возрастом и отдельными соматоморфологическими признаками, клеточным и биохимическим составом крови.

2. Провести общую и сравнительную оценку реакции аутофагии у мужчин и женщин с избыточной массой тела под влиянием комплексной оздоровительной программы и ограничения калорийности питания продолжительностью до 12 суток.

3. Выявить особенности реакции аутофагии у мужчин и женщин с избыточной массой тела на оздоровительные факторы и полное ограничение калорийности питания различной продолжительности.

4. Установить особенности реакции аутофагии и липидного спектра крови в условиях проведения комплекса оздоровительных мероприятий с разным режимом калорического обеспечения у пациентов с избыточной массой тела.

5. Выявить особенности реакции аутофагии под влиянием комплексной оздоровительной программы у пациентов с избыточной массой тела и сахарным диабетом 2-го типа.

Научная новизна работы

Впервые получена характеристика базовой активности аутофагии у лиц разного возраста, массы тела и гендерной принадлежности. Впервые показано, что базовая активность аутофагии у пациентов с избыточной массой тела характеризуется значительным варьированием и во многом зависит от индекса массы тела (ИМТ) и возраста. Так, у лиц с ИМТ более 30 кг/м² и возрасте менее 60 лет активность аутофагии превосходит таковую у лиц с ИМТ более 30 кг/м² и в возрасте более 60 лет, при этом активность у женщин превосходит таковую активность у мужчин. У лиц с ИМТ менее 30 кг/м² установлены функциональные и корреляционные связи между активностью аутофагии и содержанием

тощей, мышечной массы, общей и внеклеточной водой; у лиц с ожирением подобные связи не выявляются.

Проведена оценка реакции аутофагии у пациентов с избыточной массой тела под влиянием комплексной оздоровительной программы (КОП), включающей лечебную физкультуру, ручной и аппаратный массаж, грязелечение, магнитно-инфракрасно-лазерную и биорезонансную терапию, полную или частичную пищевую депривацию, диетотерапию (ограничение калорийности на 40-50%).

Впервые установлено, что реакция аутофагии под влиянием комплексной оздоровительной программы и частичного ограничения калорийности питания у пациентов с избыточной массой тела проявляется разнонаправленно как в сторону повышения, так и в сторону понижения. Показано, что у лиц, имеющих снижение активности, выявлены отрицательные корреляционные связи с возрастом и положительные с мышечной, тощей массой и количеством внеклеточной воды. У лиц с положительной динамикой аутофагии подобных связей не выявлено.

Доказано, что у мужчин и женщин с избыточной массой тела при сравнительной характеристике показателей аутофагии соматоморфологические признаки имеют корреляционные связи только в отдельных возрастных и весовых категориях. Реакция у мужчин характеризуется более выраженным ответом на комплексную оздоровительную программу.

Впервые показано, что у пациентов с избыточной массой тела и сахарным диабетом 2-го типа имеет место повышенная базовая активность аутофагии и слабая разнонаправленная реакция индуцированной аутофагии на комплексную оздоровительную программу; основным источником повышенного выброса маркера беклина-1 является жировая ткань.

Впервые проведена интегральная оценка аутофагии у пациентов с избыточной массой тела в условиях комплексной оздоровительной программы и полной пищевой депривации различной продолжительности (от 1 до 12 дней). Установлена ранее неизвестная периодичность в активности аутофагии в зависимости от продолжительности лечебного голодания.

Установлено, что в зависимости от степени ограничения калорийности питания у пациентов с избыточной массой тела существенно изменяются активность аутофагии и липидный состав крови.

Научная новизна подтверждается 2 патентами на изобретение (№2656510, RU; №2781901, RU).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Базовая активность аутофагии у мужчин и женщин во многом определяется массой тела, возрастом и гендерной принадлежностью; у лиц с ИМТ более 30 кг/м², а также в зрелом возрасте активность аутофагии исходно выше, чем у лиц с ИМТ менее 30 кг/м² и в пожилом возрасте; у женщин базовая активность превосходит активность у мужчин и отрицательно коррелирует с уровнем гемоглобина.

2. Реакция аутофагии у пациентов с избыточной массой тела на проведение комплексной оздоровительной программы и ограничение калорийности питания может носить разнонаправленный характер, при этом активность аутофагии у мужчин и женщин коррелирует с исследуемыми морфометрическими признаками и лабораторными показателями крови лишь в отдельных возрастных и весовых категориях.

3. Полная пищевая депривация у пациентов с избыточной массой тела на фоне проведения комплексной оздоровительной программы продолжительностью от 1-3 до 12 суток характеризуется периодичностью в активности аутофагии с повышением ее у лиц, находящихся на полной пищевой депривации 4-6 суток и 11-12 суток, и снижением у лиц, находящихся на полной пищевой депривации продолжительностью 1-3 и 7-10 суток. Предполагается, что выявленная периодизация связана с метаболическими перестройками в организме в процессе пищевой депривации.

4. Гипокалорийное питание менее 800-1200 ккал/сутки на фоне комплексной оздоровительной программы служит физиологическим инструментом для регуляции аутофагии и коррекции нарушений в липидном спектре крови у пациентов с избыточной массой тела.

5. Особенностью базовой аутофагии у пациентов с избыточной массой тела и сахарным диабетом 2-го типа является повышенная активность и слабая разнонаправленная реакция на применение комплексной оздоровительной программы.

Теоретическая значимость исследования

В работе показано, что процесс базовой аутофагии у пациентов с избыточной массой тела осуществляется на индивидуальном уровне активности и во многом определяется массой тела, возрастом и гендерной принадлежностью. Показано, что у большинства пациентов с избыточной массой тела реакция на комплексную оздоровительную программу сопровождается активацией аутофагии. В исследовании подтверждена возможность регулирования процессов аутофагии у пациентов с избыточной массой тела с помощью комплекса оздоровительных мероприятий, включающего лечебную физкультуру, ручной и аппаратный массаж, грязелечение, магнитно-инфракрасно-лазерную и биорезонансную терапию, фито-бочку и полную или частичную пищевую депривацию (ограничение калорийности на 40-50%). Дано теоретическое обоснование дифференцированного использования ограничительных диет и комплексной оздоровительной программы в качестве инструмента для регулирования активностью процесса аутофагии у мужчин и женщин с избыточной массой тела. Установлена периодичность в активности аутофагии в зависимости от сроков ограничения питания, а также разнонаправленность реакции аутофагии, требующая дальнейшего изучения механизмов данного явления. Получены теоретические доказательства того, что при дифференцированном подходе, варьируя калорийность диеты, наряду с активацией аутофагии возможно получать положительные клинические эффекты в липидном спектре крови у пациентов с избыточной массой тела.

Дано теоретическое обоснование оптимальной продолжительности применения ограничительных диет у пациентов с избыточной массой тела на фоне проведения комплексной оздоровительной программы. Особенности, выявленные у пациентов с избыточной массой тела и сахарным диабетом 2 типа, диктуют необходимость дальнейшего изучения этих явлений для понимания процессов, происходящих в организме и инсулиноцитах. Вероятным источником активности аутофагии у пациентов с избыточной массой тела и сахарным диабетом 2 типа является жировая ткань. Полученные данные расширяют фундаментальные знания о молекулярных процессах у человека в норме и патологических состояниях в условиях проведения КОП.

Практическая значимость исследования

Полученные в исследовании данные о базовой активности аутофагии у мужчин и женщин разного возраста и разной весовой категории могут служить нормативами для оценки активности процесса аутофагии при воздействии различных факторов. Для индивидуальной оценки степени активации аутофагии предложен показатель «дельта-беклин-1», который в большей степени отражает активацию процесса от исходного уровня.

Практическая значимость исследования заключается в доказательстве возможности регулирования процесса аутофагии у пациентов с избыточной массой тела с помощью оздоровительных программ и ограничения калорийности питания. С учетом саногенетической функции процесса аутофагии эти моменты особенно важны для получения комплексного оздоровительного эффекта у пациентов с избыточной массой тела. Выявленные гендерные особенности реакции аутофагии на комплексную оздоровительную программу и ограничение калорийности питания позволяют прогнозировать активность аутофагии у мужчин и женщин с избыточной массой тела.

В исследовании установлены оптимальные сроки ограничения пищевой депривации и комплексной оздоровительной программы у пациентов с избыточной массой тела для амбулаторной и клинической практики. Показано, что, регулируя активность аутофагии у

пациентов с избыточной массой тела, можно осуществлять коррекцию нарушений липидного спектра крови. Для более выраженной активации аутофагии у пациентов с избыточной массой тела и сахарным диабетом 2 типа необходимо проведение повторных комплексных оздоровительных программ.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на кафедре физической и реабилитационной медицины с курсом клинической психологии и педагогики ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации (Москва). На исследование получено разрешение локального этического комитета ФГБУ ДПО «ЦГМА» (Протокол № 05-1/2020 от 08.12.2020).

Исследование является сравнительным, ретропроспективным, рандомизированным и описательно-аналитическим, что в рейтинговой системе оценки соответствует II классу доказательности (уровень B). Все пациенты находились на лечении в ООО «Центр Здоровье» (г. Майкоп) в период с 2020 по 2021 годы. Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 года и «Правилами клинической практики в РФ», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003г. №266 и с письменного информированного согласия всех участников эксперимента в соответствии с требованиями этического комитета.

Всего в исследование было включено 106 пациентов, имеющих различные весовые характеристики и гендерную принадлежность, 87 из которых были ранжированы в соответствии с поставленной целью, задачами и описанными критериями и 77 из этих пациентов вошли в межперцентильный интервал 5-95%; 19 пациентов с нормальным весом без сопутствующей патологии вошли в контрольную группу.

Диссертационное исследование выполнено с использованием комбинированного медико-статистического анализа. Для выполнения исследования использованы современные и апробированные методы диагностики, иммуноферментного анализа, импедансометрии тела, клинические и биохимические анализы крови, а так же современные физиотерапевтические методы.

Основой методологией данного научного исследования было последовательное применение методов научного познания. Комплекс современных статистических математических методов исследования позволил корректно провести обработку материала, получить новые сведения, раскрыть цель и реализовать задачи исследования.

Связь задач исследования с проблемным планом

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации (Москва) по теме «Разработка современных программ медицинской реабилитации для повышения эффективности лечения больных с распространенными и социально-значимыми заболеваниями».

Степень достоверности, апробация и внедрение результатов

Обоснованность и достоверность полученных результатов подтверждается достаточным для решения поставленных задач объемом исследований, применением современных и адекватных методов; полученные данные качественно проанализированы с использованием статистических методов математического анализа и вариационной статистики. Результаты, полученные в исследовании, полностью отвечают современным представлениям о разрабатываемой проблеме и согласуются с данными других авторов.

Разработанный метод внедрен в практическую работу ООО «Центр Здоровье» (г. Майкоп), иммуногенетической лаборатории Адыгейского государственного университета (АГУ), иммуногенетической лаборатории Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону) и курортного комплекса «Надежда» (с. Кабардинка), а также в учебный процесс студентов лечебного факультета II-го курса медицинского института ФГБОУ МГТУ (раздел «Физиология питания»), в научно-образовательный процесс ФГБОУ ВО «Саратовский

государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» (г. Саратов), кафедры физической и реабилитационной медицины с курсом клинической психологии и педагогики ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации (Москва) и кафедры восстановительной медицины и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России (Москва).

Основные положения работы доложены и обсуждены на: 36-й Научно-практической конференции «ОБРАЗОВАНИЕ-НАУКА-ТЕХНОЛОГИИ» (ФГБОУ ВО «МГТУ»; Майкоп, 6-10 декабря, 2021 г.); XVII Национальном конгрессе терапевтов («Конкурс молодых терапевтов» (постерный доклад), г. Москва, 12-14 октября, 2022 г.); 40-й НЕДЕЛЕ НАУКИ МГТУ (ФГБОУ ВО «МГТУ»; Майкоп, 12-16 декабря 2022 г.); «День Российской науки» в рамках 30-летия со дня образования МГТУ (ФГБОУ ВО «МГТУ»; Майкоп, 8 февраля 2023 г.); Всероссийской научно-практической конференции аспирантов, докторантов и молодых ученых (ФГБОУ ВО «МГТУ»; Майкоп, 18-20 апреля 2023 г.).

Апробация диссертации проведена на кафедре физической и реабилитационной медицины с курсом клинической психологии и педагогики ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации (Москва) (Протокол №5 от 18 мая 2023 года).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 патента на изобретения и 11 статей, в том числе: 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией для публикаций результатов диссертационных исследований, 5 публикаций в иных журналах и 3 публикации в сборниках материалов научных конференций.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно сформулированы цель и задачи работы, обоснована актуальность выбранной темы, проведен анализ современной литературы, посвященной данной проблеме, сформированы группы и определены адекватные методы обследования, разработана комплексная оздоровительная программа, проведены экспериментальные исследования и анализ результатов, обоснованы выводы и практические рекомендации, подготовлены материалы для публикации и докладов, текст диссертации и автореферата.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Сфера диссертационного исследования и научные положения диссертации соответствуют пункту 2 «Изучение механизмов действия, предикторов и критериев эффективности и безопасности применения немедикаментозных лечебных факторов и медико-социальных технологий в целях персонализированного подхода при разработке технологий повышения функциональных и адаптивных резервов организма, профилактики заболеваний, медицинской реабилитации пациентов, индивидуальных программ реабилитации и абилитации инвалидов» паспорта научной специальности 3.1.33 – Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия (медицинские науки).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 180 страницах компьютерного текста и включает в себя 86 таблиц, 27 рисунков; состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследования», двух глав, представляющих результаты собственных исследований, главы «Обсуждение результатов и заключение», выводов и практических рекомендаций. Библиографический указатель включает в себя 260 источников, из них 40 отечественных и 220 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Всего в исследование были включены 106 пациентов - мужчин и женщин зрелого I и II периодов (81 человек) и пожилого возраста (25 человек), имеющих различные весовые

характеристики и гендерную принадлежность, - проходивших обследование и оздоровительный курс в ООО «Центр Здоровье» (г. Майкоп), из которых 87 пациентов с избыточной массой тела, в соответствии с поставленной целью, задачами и критериями, были ранжированы по межпроцентильным и межквартильным интервалам, 77 пациентов вошли в межпроцентильный интервал 5-95% и были включены в группу «пациенты с ожирением», согласно классификации, предложенной на VII конференции по проблемам возрастной морфологии, физиологии и биохимии и утвержденной на симпозиуме Академии педагогических наук СССР в 1965 году, разделены на возрастные группы (Е.П. Якимович, В.В. Немцова, Д.А. Ключников, 2018). В отдельных фрагментах была применена возрастная классификация ВОЗ (Ahmad O.V. et al., 2001), а также были выделены группы по возрасту – до 60 (зрелый I-период и зрелый II-период) и после 60 лет. В контрольную группу вошли 19 практически здоровых лиц в возрасте 23-56 лет с нормальной массой тела без хронических заболеваний и сахарного диабета 2 типа: $M_{cp} \pm m_0 = 37,4 \pm 7,1$ кг/м². Для выполнения исследования использованы современные и апробированные методы диагностики, иммуноферментного анализа, импедансометрии тела, клинические и биохимические анализы крови.

Участники исследования проходили профилактический оздоровительный курс на базе клиники ООО «Центр здоровье» в г. Майкопе.

У всех обследуемых рассчитывали индекс массы тела (ИМТ) по коэффициенту Кетле: отношение массы тела (кг) к росту (м²); регистрировали артериальное давление, пульс, температуру тела. Исследование компонентов состава тела проводили электроплетизмографическим методом на аппарате Medi Ld (France) с помощью программного обеспечения EIS-ESTECK (США) до проведения курса КОП и на 12 сутки. Исследовали следующие показатели: общую жировую массу (кг), мышечную массу (кг), тощую массу (кг), общую жидкость (кг), внутриклеточную воду (кг), внеклеточную воду (кг).

Активность процессов аутофагии оценивали по уровню белка Beclin-1 (беклин-1). Концентрацию беклина-1 определяли методом ИФА на аппарате «CLARIOstarplus» BMG LABTECH (Germany) при помощи тест-наборов «Cloud-Clone Corp» (USA). Концентрация маркера выражалась в пг/мл. Забор крови осуществляли утром натощак при поступлении в оздоровительный центр и на 12-й день пребывания. Продолжительность полной пищевой депривации (ПД) в отдельной группе составила от 1 до 12 суток с последующим переходом на гипокалорийное питание (800-1200 ккал/сутки); основная масса пациентов находилась на ограниченном питании (от 800 до 1200 ккал/сутки). Лабораторные исследования проводились до и после КОП и включали в себя: клинический анализ крови (с вычислением ЛИИ-лейкоцитарного индекса интоксикации Кальф-Калифа) и мочи, определение липидного спектра (общего холестерина-ОХ, ХС липопротеидов низкой плотности-ХС ЛПНП, ХС липопротеидов высокой плотности-ХС ЛПВП, триглицеридов-ТГ), уровня глюкозы натощак.

Пациенты, включенные в исследование, были разделены на группы согласно возрастным периодам, весовым характеристикам на основе индекса массы тела, гендерной принадлежности, по количеству потребляемых калорий в течение суток. Для всех пациентов проводилась комплексная оздоровительная программа, которая включала в себя следующие процедуры и мероприятия: в первый день осуществлялся прием солевого слабительного (35-40 гр. «английской соли»), затем назначалось полное или частичное ограничение калорийности пищи в течение 1-12 дней до 800-1200 ккал/сутки (диета с преобладанием сложных углеводов растительного происхождения - 60%, белков - 15%, ненасыщенных жиров - 25%) с потреблением 1,5-2,0 л воды и ограничением поваренной соли до 4 г/сутки. Дезинтоксикационные процедуры включали в себя очистительные клизмы 1 раз в сутки объемом 1,5-2,0 литра воды комнатной температуры, гидроклонолтерапию продолжительностью 20-30 мин, объемом воды до 20-30 л комнатной температуры (периодичность проведения процедуры - через день), теплый душ 2-3 раза в день. Ручной массаж проводился ежедневно по 30 мин. одной зоны позвоночника, аппаратный массаж

осуществлялся с помощью кровати-массажера и кресла-массажера продолжительностью 20-30 мин (через день). Магнитно-инфракрасно-лазерная терапия проводилась на аппарате «Милта» ЗАО «НПО Космического приборостроения» курсом 3-4 процедуры с чередованием с биорезонансной терапией, которая проводилась с помощью интерстициального сканера EIS CE 0535 системы ESTECK System Complex, USA; продолжительность процедуры -5 мин, одна процедура в 2-3 дня. Фитобочка применялась 2-3 раза в неделю (температура - 38-43°C, продолжительность процедуры 15 мин, производитель «Роскедр», Санкт-Петербург). Грязелечение осуществлялось нанесением голубой глины на суставы слоем от 2-х до 4-х см при температуре грязи 35-38°C, продолжительностью 15-20 мин., через день. Терренкур проводился ежедневно с постоянным увеличением дистанции с 3-х до 6 км и ежедневным пребыванием на свежем воздухе в течение 2,0-2,5 часов.

Контрольными точками исследования были: до начала получения программы и на 12 сутки после начала получения программы. В качестве критерия базовой активности аутофагии была концентрация белка-маркера беклина-1 в плазме крови; для оценки степени активации аутофагии был введен показатель «дельта-беклин-1»

Обработка полученных результатов

Анализ цифровых данных проводился с использованием программного обеспечения IBM SPSSStatistics (26.0). Для характеристики статистического ряда использовались процентиля 5%-95%, квартили 25%-75% с вычислением среднего значения, ошибки средней, стандартной ошибки средней. Для сравнения средних значений использовали параметрические и непараметрический U-критерий Манна-Уитни, t-критерий Стьюдента для независимых выборок. В целях выявления связей между исследуемыми параметрами использовался корреляционный анализ Пирсона. Связь считалась достоверной при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исходном состоянии в общей группе показатели уровня Beclin-1 у лиц с различной массой и возрастом варьировали в широких пределах от 0,1 до 1014,44 пг/мл. Наличие такого разброса в показателях обосновало анализ выборки с использованием процентилей (5%-95%) и квартилей (25%-75%). В межперцентильный интервал 5%-95% были включены показатели 77 человек, а в межквартильный интервал 25%-75% показатели 43 человека. Показатели контрольной группы составили $37,4 \pm 7$ пг/мл.

Прежде всего был проведен анализ показателей по укрупненным возрастным группам (до и после 60 лет). Ограничение калорийности питания характеризовалось появлением отрицательных корреляционных взаимосвязей между уровнем беклина-1 и возрастом во всей группе, а также у лиц с ИМТ > 30 кг/м² (Рисунок 1).

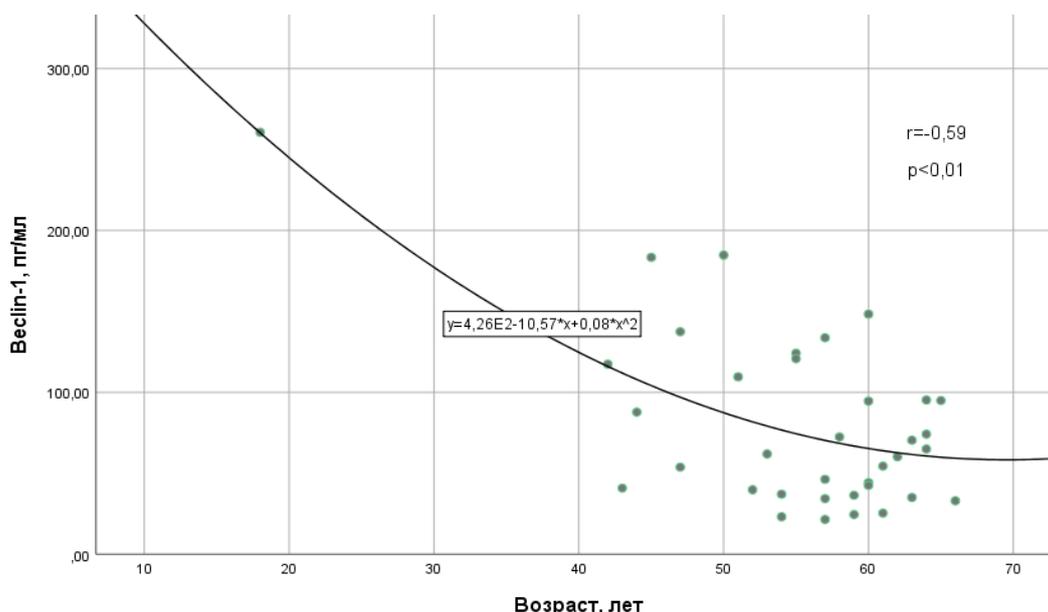


Рисунок 1 – График корреляционной зависимости между возрастом и Веclin-1 у лиц с ИМТ > 30 кг/м² после КОП

Ранее было показано (Del Roso, A. et al., 2003; Donati A. et al., 2001), что у грызунов и в изолированных клетках печени активность аутофагии снижается по мере старения. В наших исследованиях при ограничении питания на фоне КОП мы наблюдали аналогичное явление в организме человека.

Как свидетельствуют данные Таблицы 1, у пациентов, входящих в межквартильный интервал 25-75%, статистически значимые различия обнаружены между показателями уровня Веclin-1 до КОП в группах до и более 60 лет, а также между группами с ИМТ до и свыше 30 кг/м². После КОП в возрасте до 60 лет уровень беклина-1 превосходил показатели у лиц группы после 60 лет ($p < 0,04$), а также превосходил базовый уровень контрольной группы на 82,8% ($p < 0,01$). Обращает на себя внимание значительное увеличение после КОП уровня беклина-1 относительно исходного у лиц старше 60 лет ($p < 0,007$), что на 34% ($p < 0,01$) выше, чем исходный уровень контрольной группы. Концентрация беклина-1 оказалась исходно выше у лиц с ИМТ более 30 кг/м² ($p < 0,007$), а также у лиц в возрасте менее 60 лет ($p < 0,012$). Оценивая роль фактора массы тела, можно отметить, что у лиц с ИМТ ≤ 30 кг/м² концентрация беклина-1 достоверно ($p < 0,01$) увеличивалась после КОП относительно исходных показателей ($p < 0,01$ и показателей контрольной группы на 40,1% ($p < 0,01$). Увеличение концентрации у обследованных с ИМТ > 30 кг/м² по сравнению с исходными показателями было близко к достоверному ($p < 0,06$), но превосходило уровень беклина-1 у лиц с ИМТ ≤ 30 кг/м² после КОП и на 78,8% ($p < 0,01$) относительно показателей контрольной группы.

Наличие возрастных особенностей в корреляционных связях мотивировали проведение анализа с абсолютными значениями показателя беклина-1 в различных возрастных группах (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительный анализ уровня Веclin-1 в зависимости от возраста по укрупненным возрастным группам и индекса массы тела (ИМТ) до и после КОП в межквартильном интервале 25-75%

Исследуемые группы	Концентрация Веclin-1 ($M_{cp} \pm m_0$), пг/мл		
	До КОП	После КОП	Достоверность
Пол мужской (n=11)	36,3±5,3	63,8±6,2	<0,003
Пол женский (n=32)	51,9±3,8	59,3±3,8	<0,2
Возраст до 60 лет (n=30)	53,2±4,1	68,4±5,2	<0,05

Возраст после 60 лет (n=11)	34,7±3,3	50,2±4,0	<0,007
ИМТ <30 кг/м ² (n=13)	35,1±3,7	52,4±4,5	<0,01
ИМТ ≥30 кг/м ² (n=27)	54,1±4,3	66,9±5,1	<0,06
Здоровые (контрольная группа) (n=19)	37,4±7,1	59,4±7,7	<0,046

Гендерные различия заключались в том, что у мужчин базовый уровень концентрации беклина-1 значительно уступал таковому у женщин. Во всей исследуемой группе у лиц до 60 лет концентрация беклина-1 также превосходила концентрацию у лиц после 60 лет ($p < 0,012$), однако у женщин после 60 лет до проведения КОП концентрация беклина-1 оказалась значительно ниже, чем у женщин до 60 лет ($p < 0,008$). Такого различия не выявлялось у мужчин.

Реакция на КОП существенно различалась у мужчин и женщин как во всей группе в целом, так и отдельных возрастных группах. Так, у мужчин КОП вызывала значительный подъем уровня беклина-1 относительно исходного ($p < 0,003$) и на 70,5% относительно показателей контрольной группы, чего нельзя было сказать относительно женщин ($p < 0,2$). Более того, концентрация беклина-1 после КОП оказалась даже ниже ($p < 0,002$), чем у мужчин (но превышала уровень показателей контрольной группы на 58,5%; $p < 0,02$). Это нивелировало разницу в показателях у мужчин и женщин после КОП по абсолютным значениям уровня беклина-1.

Если выделить основные гендерные различия в реакциях на КОП, то они заключались в том, что у мужчин зрелого возраста и пожилых концентрация беклина-1 возрастала в среднем в 2 раза ($p < 0,032$ и $p < 0,006$ соответственно), а у женщин обеих возрастных групп оставалась либо на тех же уровнях, либо ниже исходного. При этом уровень беклина-1 у женщин пожилого возраста после КОП значительно ($p < 0,037$) уступал показателям женщин зрелого возраста.

Таким образом, исходный уровень беклина-1 характеризуется более высокими его показателями у женщин всей группы, но особенно в зрелом возрасте, а в возрастной группе пожилых показатели оказались значительно ниже, чем у женщин зрелого возраста. В данном фрагменте исследования был подтвержден факт снижения активности аутофагии по мере увеличения возраста человека. В литературе имеется подтверждение данному факту, которое получено на лабораторных животных и на отдельных культурах клеток (Luevano-Martinez L.A. et al., 2017).

Реакция на КОП характеризовалась значительной активацией аутофагии у мужчин всей группы, включая лиц до и после 60 лет. У мужчин уровень беклина-1 после КОП достоверно превосходил исходный уровень и уровень беклина-1 после КОП в группе женщин.

Сравнение показателей в разных группах, разделенных по возрасту согласно классификации ВОЗ, не выявил достоверных различий в концентрации маркера после КОП. Единственная особенность, которую удалось установить, – это наличие более высокого уровня беклина-1 у женщин молодого возраста в сравнении с пожилыми женщинами ($p < 0,02$). Эти данные подтверждают выявленную зависимость снижения активности аутофагии с увеличением возраста.

Следующим этапом исследования был вопрос об источнике беклина-1 в организме человека. В какой-то степени на этот вопрос мог ответить корреляционный анализ между уровнем беклина-1 и составом тела. Данные Таблицы 2 и Рисунков 2 и 3 свидетельствуют о том, что наиболее значимые корреляционные связи регистрируются у лиц с индексом массы тела менее 30кг/м².

Таблица 2 – Корреляционная зависимость между показателями состава тела и концентрация Веслин-1 до КОП в группах с различным индексом массы тела (5%-95%)

Исследуемые группы	Коэффициент корреляции					
	До КОП					
	М.М.	Т.М.	Ж.М.	ОВТ	Внек. жидк.	Внут. жидк.
Вся группа (n=77)	0,04	0,05	0,07	0,06	0,09	0,01
ИМТ <30 (n=24)	0,39*	0,39*	0,26	0,39*	0,47*	0,23
ИМТ ≥30 (n=53)	-0,05	-0,05	0,04	-0,02	-0,02	0,69

Примечание: М.М. – мышечная масса; Т.М. – тощая масса; Ж.М. – жировая масса; ОВТ – общая вода тела; Внек. жидк. – внеклеточная жидкость; Внут. жидк. – внутриклеточная жидкость. *достоверность – $p < 0,05$. * - корреляция значима на уровне $p < 0,05$.

Так, достоверные связи (Рисунок 2) выявлялись между базовым уровнем беклина-1 и мышечной (Рисунок 3), тощей массой, содержанием общей воды и внеклеточной воды.

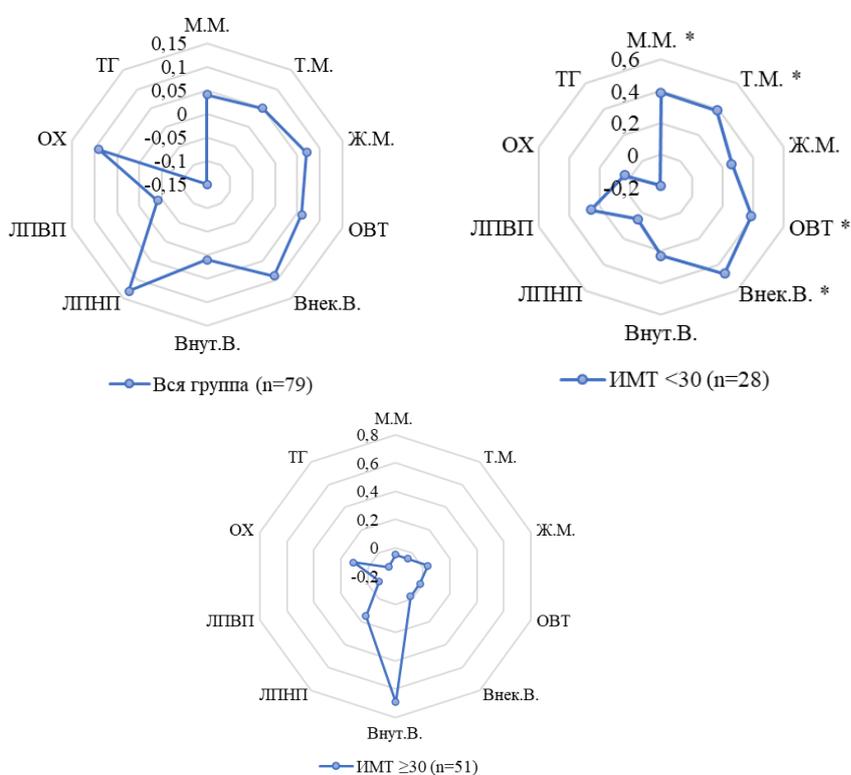


Рисунок 2 – Коэффициенты корреляций между уровнем беклина-1 и компонентами состава тела до курса КОП в группах с разным индексом массы тела (* - $p < 0,05$)

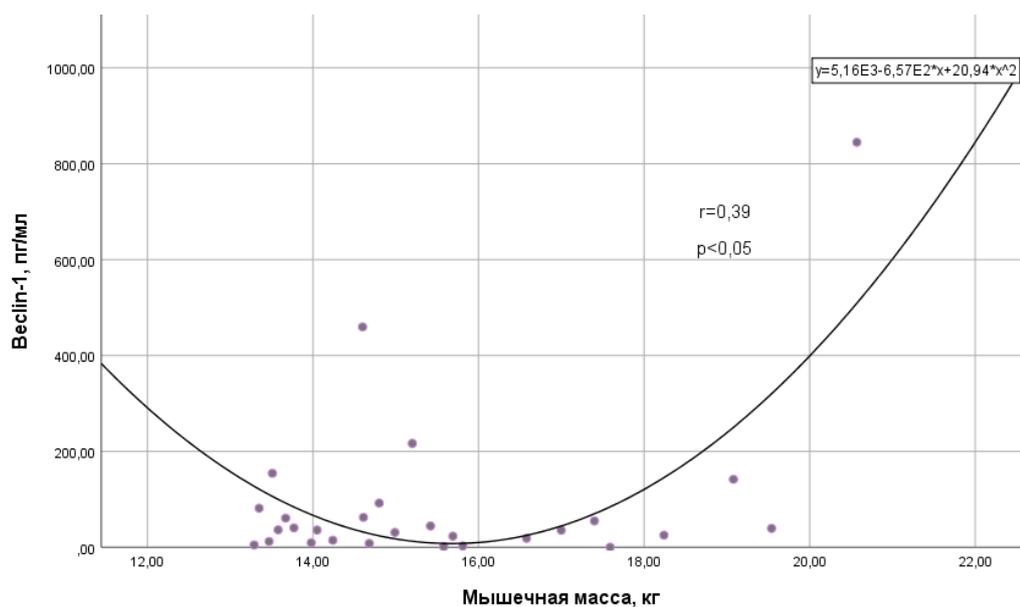


Рисунок 3 – График корреляционной зависимости между мышечной массой и Veslin-1 до КОП у лиц с ИМТ 30 кг/м^2

Согласно исследованиям (Brandt N., Gunnarsson T.P., Bangsbo J., Pilegaard H. 2018; Ferhat M., Funai K., 2019), мышечная ткань может служить источником активности аутофагии во всем организме.

Аналогичные данные были получены при анализе корреляционной связи между уровнем Veslin-1 и тощей массой ($r=0,39$, $p < 0,05$). Были установлены прямые достоверные связи между содержанием общей воды и Veslin-1 и внеклеточной водой и Veslin-1 у лиц с ИМТ $\leq 30 \text{ кг/м}^2$. Характерно то, что у лиц с ожирением (Рисунок 4) такие связи отсутствовали. Это может свидетельствовать о полной разбалансировке функциональных связей между активностью Veslin-1, компонентами состава тела и показателями липидного спектра у лиц с ИМТ $> 30 \text{ кг/м}^2$. Такая положительная связь во всей группе выявлялась только между уровнем беклина-1 после КОП и ХС ЛПВП ($p < 0,05$).

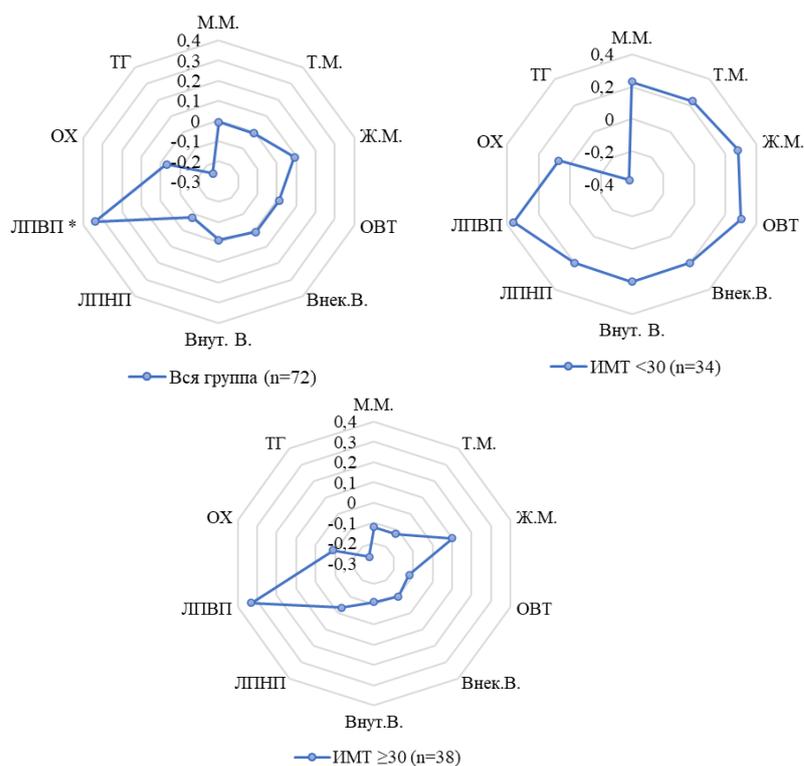


Рисунок 4 – Коэффициенты корреляций между уровнем беклина-1 и компонентами состава тела после курса КОП в группах с разным индексом массы тела (* - $p < 0,05$).

Анализируя реакцию беклина-1 с общеклиническими анализами крови (Таблица 3) до КОП, во всей исследуемой группе была выявлена слабая отрицательная связь у женщин между уровнем беклина-1 и концентрацией гемоглобина ($r = -0,25$; $p < 0,05$) и положительная связь с количеством эозинофилов ($r = 0,53$; $p < 0,01$). У мужчин аналогичная связь подтвердилась с количеством эозинофилов в зрелом возрасте I-го периода (молодой по классификации ВОЗ) ($p < 0,01$).

Более детальный анализ корреляционных связей до КОП в зависимости от исходной массы выявил наличие обратных связей у женщин с нормальным весом с уровнем гемоглобина и количеством эритроцитов и положительных связей с количеством эозинофилов ($r = 0,48$; $p < 0,05$). У мужчин с нормальным весом, также как у женщин, выявлялась достоверная связь с количеством эозинофилов ($r = 0,97$; $p < 0,05$). Однако в группе мужчин с ожирением выявлялась положительная корреляционная связь с количеством лейкоцитов, а у женщин с ожирением - с количеством эозинофилов. Этот факт можно частично объяснить тем, что жировая ткань является одним из источников провоспалительных цитокинов (Jun-Ming Z., Jianxiong A., 2007). Воспалительные реакции могут быть источником эндотоксикоза, о чем свидетельствует положительная корреляционная связь ($r = 0,30$; $p < 0,05$) между уровнем беклина-1 и индексом интоксикации (ИИ) у женщин зрелого возраста до проведения КОП.

Таблица 3 – Корреляционный анализ между концентрацией беклина-1 и показателями общеклинического анализа крови в зависимости от возраста до КОП у мужчин и женщин разных возрастных групп (5%-95%)

Исследуемые группы/ возраст	Пол	Коэффициент корреляции									
		Эр.	Гем.	Лейк	Баз.	Эоз.	Нейт.	Лимф.	Мон.	СОЭ	ЛИИ
Вся группа (n=17)	М	0,06	0,11	0,26	0,37	0,37	-0,23	0,04	0,3	0,09	0,03

Вся группа (n=50)	Ж	-0,23	-0,25*	-0,09	0,04	0,53*	-0,09	0,03	-0,14	-0,02	0,11
Зрелый I и II. (n=12)	М	0,04	-0,01	0,02	0,6	0,4	-0,2	-0,09	0,3	0,2	-0,08
Зрелый I и II. (n=38)	Ж	-0,2	-0,3*	-0,08	0,1	0,6**	-0,1	-0,05	-	-0,01	0,3*

Примечание: Эр. – эритроциты; Гем. – гемоглобин; Лейк. – лейкоциты; Баз. – базофилы; Эоз. – эозинофилы; Нейт. – нейтрофилы сегментоядерные; Лимф. – лимфоциты; Мон. – моноциты; ЛИИ. – лейкоцитарный индекс интоксикации *достоверность – $p < 0,05$; **достоверность – $p < 0,01$; I и II соответственно периоды зрелого возраста; М-мужчины, Ж-женщины

Таким образом, до КОП для женщин зрелого возраста и женщин с ожирением характерно наличие прямых корреляционных связей между уровнем беклина-1 и количеством эозинофилов. Особенностью у женщин всей группы и в значительной степени в зрелом возрасте II-го периода является наличие отрицательной корреляционной связи с уровнем гемоглобина и количеством эритроцитов. Возможно, данные процессы связаны с овуляторным циклом у женщин и соответствующими перестройками в слизистой матки (Choi J.Y. et al., 2014).

Большой интерес представляли сведения о степени активации процесса аутофагии на фоне проведения КОП. Важно было оценить не только абсолютные значения беклина-1, но и степень активации процесса, т.е. реакцию Beclin-1 на КОП в зависимости от исходного его уровня. Для этого был введен коэффициент «дельта» с соответствующим знаком (+ или -).

Из всей группы (77 человек) пациентов, входящих в интервал 5%-95%, подъем уровня беклина-1 после КОП отмечен у 49 человек (63,6%), а снижение - у 28 человек (36,4%) (Рисунок 5).

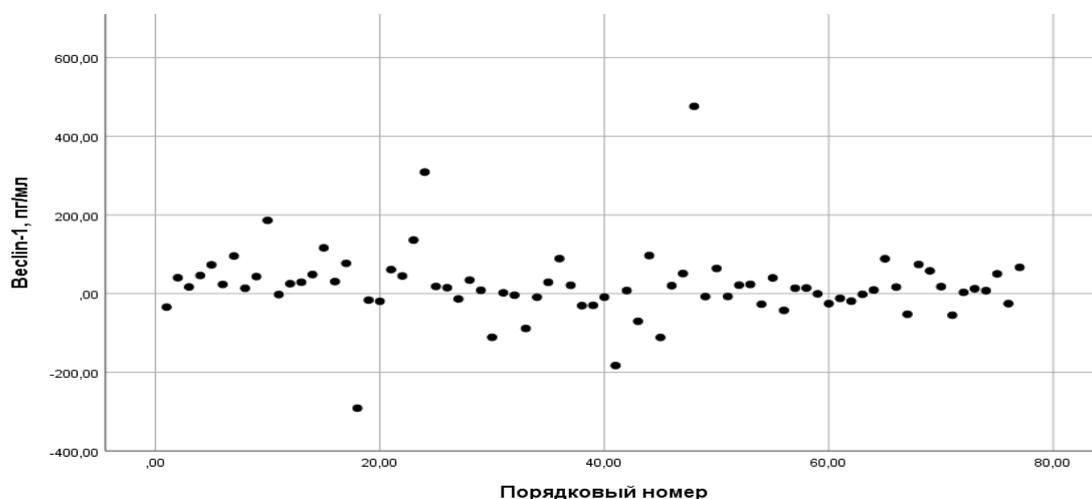


Рисунок 5 – График диаграммы рассеяния показателя «дельта беклина-1» после КОП во всей исследуемой группе

Таким образом, воздействие комплексной оздоровительной программы с ограничением питания вызывало разнонаправленную реакцию активности Beclin-1 как в сторону повышения концентрации, так и в сторону ее снижения. Механизмы этих явлений довольно сложные, но на этот счет в литературе уже имеются некоторые данные. Так, у млекопитающих одним из важнейших регуляторов внутриклеточных процессов в условиях измененного энергетического обеспечения является протеинкиназа mTORC1 (Mathieu Laplante, David M. Sabatini, 2012), которая является мишенью молекулы макролида рапамицина. Указанная киназа является сенсором, реагирующим на энергетическое обеспечение, уровень аминокислот, кислорода, степень оксидационного стресса и

аутофагию. В частности, mTORC1 ингибирует аутофагию, регулируя таким образом анаболические и катаболические процессы в клетке (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009), а снижение поступления энергетических субстратов в клетку, в свою очередь, ингибирует активность mTORC1.

Проанализировав полученные результаты можно предположить, что различная степень активации (или инактивации) аутофагии может регулироваться многочисленными и многообразными входящими сигналами, поступающими на mTORC1: лазерно-инфракрасным излучением, массажем мышц, физической нагрузкой, степенью ограничения калорийности питания, продолжительностью ограничения питания, уровнем стрессогенности процедур, количеством жировой и мышечной массы, наличием поврежденных органелл, денатурированных белков и др. (Зенков Н.К., Чечушков А.В. и др., 2019).

Дальнейший анализ полученных данных показал, что у лиц, реагирующих снижением уровня Beclin-1 после КОП, в исходном состоянии имели место отрицательные связи между уровнем Beclin-1 и возрастом ($r=-0,4$; $p<0,05$) и положительные - с мышечной ($r= 0,35$; $p<0,05$), тощей массой ($r=0,35$; $p<0,05$) и внеклеточной водой ($r=0,48$; $p<0,01$). У лиц с положительной дельтой таких взаимосвязей по компонентам тела до проведения КОП выявлено не было.

После курса применения КОП и ограничения калорийности питания у лиц, реагирующих подъемом уровня Beclin-1 (положительная дельта), выявлены положительные корреляционные связи между уровнем Beclin-1 и весом ($r=0,25$; $p <0,05$), ИМТ ($r=0,3$; $p <0,05$) и жировой массой ($r=0,27$; $p <0,05$). В подтверждение этим фактам в литературе обнаружены данные о повышенной активности генов аутофагии в биоптатах жировой ткани у лиц с ожирением (Kovsan et al., 2011). При этом авторы не обнаружили гендерных отличий в активности исследуемых генов.

В нашем исследовании у лиц, у которых отмечалось снижение уровня Beclin-1 после КОП, выявлялись отрицательная корреляционная связь между Beclin-1 и возрастом ($r=-0,35$; $p <0,05$) и положительная с внеклеточной водой ($r=0,38$; $p <0,05$).

Наличие функциональных и корреляционных связей могли найти свое отражение в биохимических показателях крови, в частности ее липидном спектре. Особый интерес представляли сведения о соотношении этих связей в зависимости от суточного калоража. Оказалось, что ограничение калорийности на фоне процедур КОП приводит к однонаправленному изменению ХС ЛПВП и активности Beclin-1 во всей группе; повышение уровня Beclin-1 сопровождается параллельным повышением фракции ЛПВП и снижением уровня триглицеридов. Возможно, это одно из звеньев антиатеросклеротического действия гипокалорийного питания как одного из главных стрессогенных факторов.

Как видно из Таблицы 4, более жесткие и высоко достоверные связи устанавливались между уровнем ХС, ЛПВП и беклином-1 у лиц, получавших менее 800 ккал/сутки. У лиц, получавших более 800 ккал/сут выявлена достоверная отрицательная связь между концентрацией беклина-1 и уровнем триглицеридов. Эти результаты позволяют говорить о возможности целенаправленного воздействия калорийностью диеты на основные компоненты липидного обмена. Однако при этом следует учитывать возраст пациента.

Таблица 4 – Корреляционные связи между показателями липидного спектра и уровнем Beclin-1 в группах с калорийностью питания ≤ 800 ккал/сутки и >800 ккал/сутки (n=65)

Исследуемые группы	Коэффициент корреляции			
	ХСЛПНП	ХСЛПВП	ОХ	ТГ

Ккал ≤800 (n=27)	-0,35	0,66**	-0,1	-0,23
Ккал >800 (n=38)	0,13	0,06	-0,01	-0,34*

Примечание: * - корреляция значима на уровне $p < 0,05$; ** - корреляция значима на уровне $p < 0,01$.

В подтверждение этому были получены данные о том, что с увеличением возраста у лиц, получавших 800 ккал/сутки и менее на фоне КОП, активность маркера беклина-1 достоверно уменьшалась. Если пациенты получали более 800 ккал/сутки, то возраст уже не играл значения, а существенными факторами становились вес, ИМТ, жировая масса. В Таблице 5 приведены данные о наличии отрицательной корреляционной связи у лиц, потребляющих менее 800 ккал/сут, между уровнем Beclin-1 и возрастом ($r = -0,61$; $p < 0,01$), а у лиц, потребляющих более 800 ккал/сут, выявлены положительные связи между уровнем Beclin-1 и весом ($r = 0,42$; $p < 0,05$), ИМТ ($r = 0,36$; $p < 0,05$) и жировой массой ($r = 0,37$; $p < 0,05$).

Таблица 5 – Корреляционная связь между исследуемыми компонентами состава тела и уровнем беклина-1 у лиц с различной величиной потребления калорий в процессе КОП (межперцентильный интервал 5%-95%)

Исследуемые группы	Коэффициент корреляции								
	Возраст и состав тела после КОП								
	Возраст	Вес	ИМТ	М.М.	Т.М.	Ж.М.	ОВТ	Внек. жидк.	Внут. жидк.
Ккал ≤800 (n=27)	-0,61**	-0,16	0,02	-0,17	-0,17	0,01	-0,06	-0,04	-0,2
Ккал >800 (n=38)	-0,14	0,42**	0,36*	0,03	0,03	0,37*	0,03	-0,04	0,08

Примечание: ИМТ – индекс массы тела; М.М. – мышечная масса; Т.М. – тощая масса; Ж.М. – жировая масса; ОВТ – общая вода тела; Внек. жидк. – внеклеточная жидкость; Внут. жидк. – внутриклеточная жидкость. * достоверность – $p < 0,05$; ** достоверность – $p < 0,01$.

Общая тенденция во всей группе характеризовалась снижением активности аутофагии с возрастом после КОП (Рисунок 6). Этот факт в определенной степени обосновывает «физиологичность» диеты с калорийности более 800 ккал/сут.

Пищевая депривация несколько изменила соотношение корреляционных связей, зарегистрированных до КОП, что выразилось в появлении положительных корреляций после КОП у мужчин между беклином-1 и весом, индексом массы тела и жировой массой во всей группе. Особенно явно эта связь прослеживалась у мужчин зрелого и пожилого возраста ($p < 0,01$) и у женщин зрелого (среднего) возраста II-го периода ($p < 0,05$).

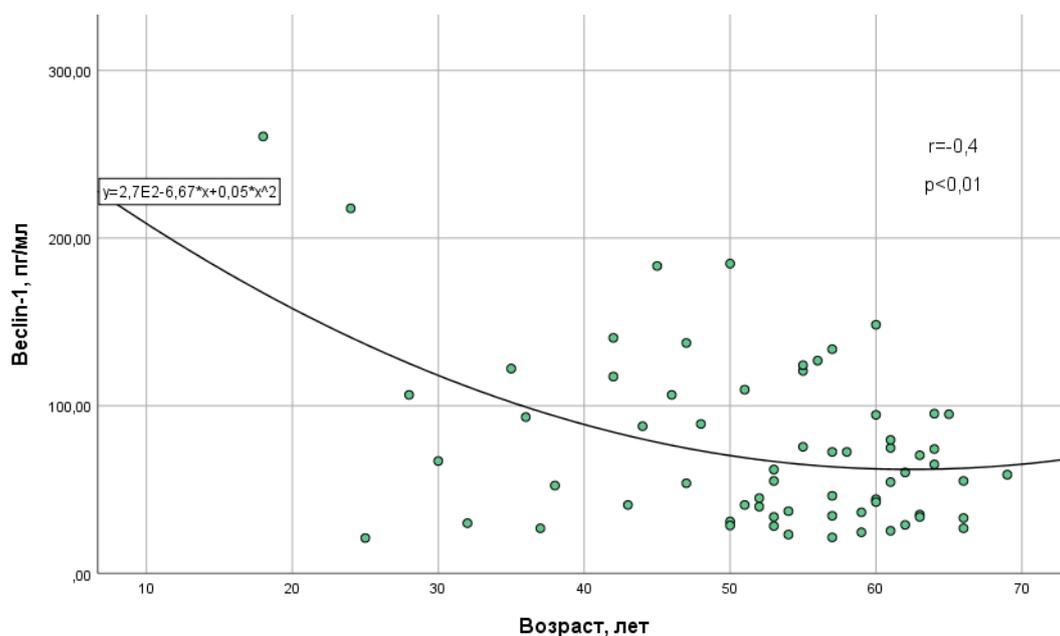


Рисунок 6 – График корреляционной зависимости между уровнем беклина-1 и возрастом после КОП во всей исследуемой группе

Таким образом, если брать во внимание возрастные особенности пациентов, то общей реакцией у мужчин и женщин на КОП является наличие положительных корреляционных связей с весом у мужчин и женщин зрелого (среднего) возраста II-го периода, а отличием является наличие прямой достоверной связи у мужчин зрелого и пожилого возраста с жировой массой ($r=0,76$; $p < 0,01$). Наличие корреляционных связей после КОП с жировой массой было выявлено у женщин с нормальной массой ($r=0,38$; $p < 0,05$) и у мужчин с ожирением ($r=0,82$; $p < 0,05$).

Что касается реакций липидного спектра в зависимости от гендерных и весовых особенностей, то после КОП зафиксирована положительная корреляционная зависимость с ХС ЛПВП ($r=0,34$; $p < 0,05$) у женщин во всей группе, а также у женщин зрелого (среднего) возраста II-го периода ($r=0,53$; $p < 0,05$). Подобных корреляций у мужчин после КОП не выявлялось. Однако, при анализе этих показателей без возрастных различий было выявлено наличие положительной корреляционной связи между ХС ЛПВП и уровнем беклина-1. Эта взаимосвязь оказалась и для мужчин и женщин общей.

Наиболее оптимальные с позиций физиологии и реабилитологии можно считать наличие корреляций у мужчин пожилого возраста, характеризующихся отрицательными связями дельты беклина-1 с уровнем ХС ЛПНП ($r=-0,99$; $p < 0,05$), общим холестерином-ХС ($r=-0,98$ $p < 0,01$) и положительной связью с ХС ЛПВП ($r=0,94$; $p < 0,01$). Интересным фактом является то, что при группировании пациентов по весовой категории выявлялись прямые достоверные связи лишь у женщин с нормальным весом между общим холестерином, триглицеридами и дельтой беклина-1. У мужчин такой закономерности не выявлялось.

Неоднозначные изменения в липидном спектре у мужчин и женщин разного возраста и массы тела при различных уровнях активности аутофагии могли отражать различные этапы регуляции и метаболизма липидов в организме. Из литературы известно, что аутофагия активно регулирует липидный обмен, включая его ключевые составляющие (Singh R. et al., 2009; Weidberg H. et al., 2009).

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что у лиц с нормальным весом уровень активности аутофагии, по-видимому, принимает участие в поддержании физиологических концентраций общего холестерина и триглицеридов. В этих условиях регулятором активности беклина-1 (кроме киназы mTOR) может выступать группа белков сиртуинов. В свою очередь, в качестве триггера экспрессии сиртуина-1 и сиртуина-3 может

выступать дефицит энергетических субстратов. В своем обзоре Rusakova E. et al., (Rusakova E.A. et al., 2018) показала, что ген SIRT1 способствует процессу выработки глюкозы в печени и метаболизму жира (Horio Y. et al., 2011). В ряде работ действительно подтверждено, что SIRT1 активирует процесс глюконеогенеза в печени (Rodgers J.T. et al., 2007), окисление жирных кислот в мышцах (Gerhart-Hines Z. et al., 2007) и мобилизацию жира в жировой ткани (Picard F. et al., 2004). В плане исследуемой авторами проблемы важно отметить, что нарушенная функция SIRT1 в жировой ткани у генетически жирных мышей (ADIPO-H363Y) восстанавливалась при ограничении калорийности питания (Xu C. et al., 2015). Кроме того, известно (Sun T. et al., 2015; Qiu G. et al., 2016), что деацетилирование Beclin-1 под воздействием SIRT1, как это следует из литературных данных, сопровождается увеличением количества аутофагосом. Для их построения требуются компоненты, включая холестерин, ЛПНП, ЛПВП. Возможно, что эта регуляция липидного обмена осуществляется через сиртуин-1. Сложность биохимических взаимосвязей, вероятно, определяет различные варианты изменений липидного обмена в зависимости от возраста, массы тела, активности аутофагии. Содружественная реакция SIRT1 и Beclin-1 у пожилых мужчин, по-видимому, проявлялась наиболее физиологично, а именно, в тенденции к снижению ЛПНП и повышению ЛПВП. Однако этот вопрос требует специального изучения.

Степень активации аутофагии в большей степени характеризует показатель «дельта-беклин-1», Показатель характеризует процент увеличения концентрации от исходного уровня, что важно при значительной вариабельности базового уровня концентрации беклина-1. В этом случае общие закономерности после КОП выявляются как у мужчин зрелого (молодого возраста по ВОЗ) возраста I-го периода, так и у женщин зрелого (среднего возраста по ВОЗ) возраста II-го периода, характеризующиеся наличием положительной корреляционной связи между дельтой беклина-1 и мышечной, тощей массой и общей водой. Отличительной чертой у мужчин пожилого возраста является наличие отрицательной корреляционной связи с жировой массой. Возрастные отличия заключались еще и в том, что у лиц пожилого возраста активация аутофагии была достоверно более значима (в 2 раза), чем у лиц моложе указанного возраста.

Отдельно следует отметить, что у пациентов, страдающих сахарным диабетом 2-го типа, базовая активность аутофагии достоверно превосходила базовую активность у лиц без сопутствующей патологии ($64,0 \pm 10,1$ пг/мл и $37,4 \pm 7,1$ пг/мл соответственно; $p < 0,036$). Однако реакция на применение КОП у первых оказалась слабо выраженной и разнонаправленной ($p < 0,51$), а у вторых – с достоверным подъемом уровня беклина-1 ($p < 0,046$). Возможно, что такие сдвиги являются проявлением так называемой «репаративной аутофагии», направленной на восстановление ее нарушенных механизмов.

Выявленные корреляционные связи позволяют предположить, что источником повышенных концентраций маркера беклина-1 у женщин с нормальным весом и у мужчин с ожирением является в основном жировая ткань, а у мужчин зрелого (молодого по ВОЗ) возраста I-го периода и у женщин зрелого (среднего по ВОЗ) возраста II-го периода в большей степени основным источником является мышечная и тощая масса. Кроме того, была выявлена отрицательная корреляционная связь у пожилых мужчин беклина-1 с жировой массой. Следует отметить, что в литературе описаны аналогичные реакции в экспериментах на животных с ожирением. В частности, было показано, что у таких животных имеет место высокая активность mTORC1 (Khamzina L. et al., 2005), которая способна ингибировать аутофагию.

Результаты исследования активности беклина-1 после КОП на фоне полной пищевой депривации. Исследуемая группа составила 31 человек, из них 9 мужчин и 22 женщины в возрасте от 21 до 66 лет. Протяженность дней полной пищей депривации составляла от 1 до 12 дней. Оценку активности аутофагии проводили по разнице (дельта) между концентрацией беклина-1 до- и после КОП на 12 сутки (в межперцентильном интервале 5%-95%). На

Рисунке 7 обращают на себя внимание 2 условных точки: 4-6 и 11-12 сутки, когда активность аутофагии возрастала и оставалась достаточно высокой, вплоть до 12 суток.

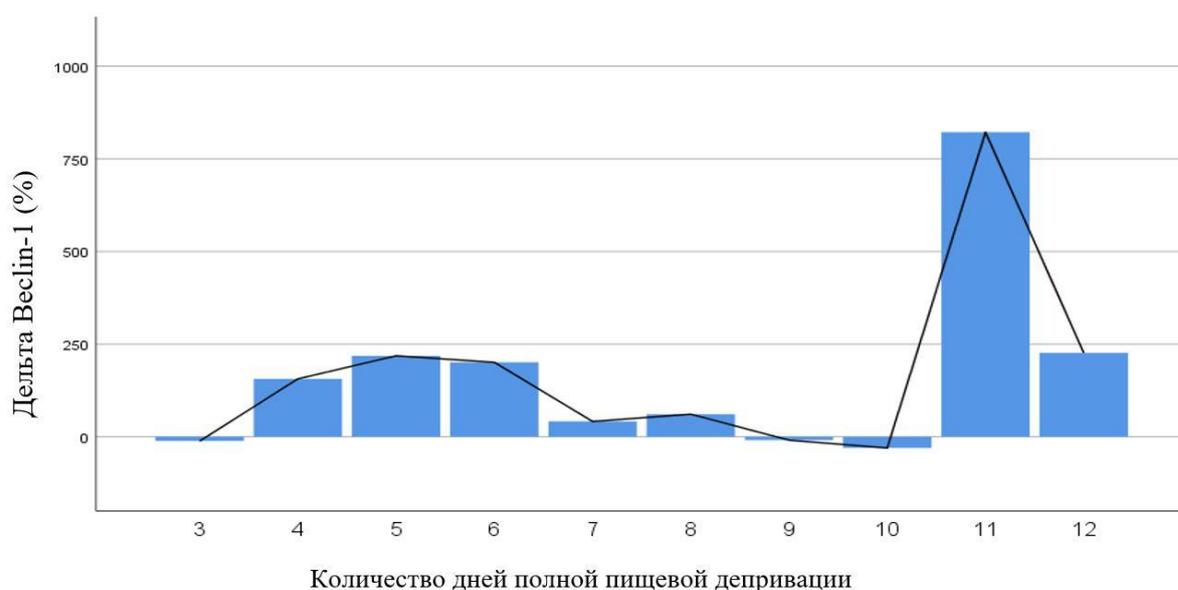


Рисунок 7 – Гистограмма показателя «дельты беклина-1» в различные периоды полной пищевой депривации

Наибольшая активность отмечена у пациентов, продолжающих к моменту забора крови (на 12 сутки) голодать либо прекративших голодание на 11 сутки.

У пациентов, проголодавших более 9-10 суток на фоне КОП, концентрация беклина-1 определялась ниже исходного. Аналогичная картина отмечена у пациентов, проголодавших 1- 3 суток и перешедших на гипокалорийное питание. Детальный анализ показал, что реакция аутофагии на голод и КОП оказалась неоднозначной. Так, из 28 обследованных, входящих в межпроцентильный интервал 5%-95%, у 17 (61,0%) человек отмечена активация процесса аутофагии (положительная дельта беклина-1), а у 11 (39,0%) человек снижение активности ниже исходного. Таким образом, реакция на голод в условиях КОП оказалась разнонаправленной и фазной.

Различия в реакциях на ограничение поступающих с пищей калорий и КОП, вероятно, могут быть связаны со степенью стрессогенности оздоровительной программы, в частности, с ограничением потребляемых калорий. Основным стрессовым фактором в используемой оздоровительной программе, по нашему мнению, является голод, который включает стрессовые механизмы, особенно в первые дни КОП, не исключая участие важнейших внутриклеточных сенсоров-mTOR и белков сиртуинов. В научной литературе появились сообщения о том, что ограничение калорийности питания после эпизода активации аутофагии через 6-24 часа сопровождается торможением этого процесса (Пупышев А.В., 2014; Yu L. et al, 2010). Снижению аутофагии предшествует этап рефосфорилирования mTOR- фермента, являющегося сенсором энергетических запасов в клетках. Дальнейший ход событий с участием аутофагии наряду с переходом на «внутренне питание» характеризовался цикличностью, связанной, по всей вероятности, с метаболическими перестройками во время голодания, особенно с развитием кетоацидоза и ацидотического криза (Кокосов А.Н., 2007). Это предположение основывается на том, что снижение активности аутофагии совпадает по времени с периодами нарастания метаболического ацидоза во время голодания.

Следует отметить, что у лиц, реагирующих на голод и КОП повышением активности аутофагии, выявлялась отрицательная корреляционная зависимость с индексом массы тела ($r=-0,4$; $p < 0,05$). Так, у лиц с более низкими значениями ИМТ активность аутофагии была более значима для организма в период голодания. Не исключено, что в периодизации

активности аутофагии существенную роль играет гормон инсулин, концентрация которого может существенно меняться в процессе голодания. Известно, что инсулин способен ингибировать активность аутофагии (Arigo S. et al., 2001; Meijer A.J., Codagno P., 2004).

Проведенный анализ полученных результатов в работе позволил сделать ряд практических рекомендаций и выводов, отвечающих на задачи данного исследования.

ВЫВОДЫ:

1. Факторами, определяющими базовую активность аутофагии пациентов, являются возраст, масса тела и гендерная принадлежность; с возрастом у лиц после 60-ти лет активность снижается, а у лиц с ИМТ более 30 кг/м² и зрелом возрасте активность достоверно превосходит активность у лиц с ИМТ менее 30кг/м² ($p < 0,007$) в пожилом возрасте ($p < 0,012$), при этом у женщин она исходно выше, чем у мужчин ($p < 0,037$) и отрицательно коррелирует с концентрацией гемоглобина; уровень активности у лиц с ИМТ менее 30кг/м² положительно коррелирует с мышечной и тощей массой ($r=0,39$; $p < 0,05$), содержанием общей и внеклеточной воды ($r=0,39$; $p < 0,05$), а у лиц с ИМТ более 30 кг/м² такие взаимосвязи не выявляются.

2. Комплексная оздоровительная программа с частичным ограничением калорийности питания у мужчин и женщин сопровождается двумя типами реакций аутофагии с повышением активности (62,3%) и понижением (37,7 %); у мужчин зрелого и пожилого возраста реакция на КОП проявляется более выраженным ростом концентрации маркера аутофагии по сравнению с женщинами, а соматоморфологические признаки играют роль только в отдельных весовых и возрастных категориях: у женщин концентрация беклина-1 коррелирует с содержанием жира ($r=0,38$; $p < 0,05$) в группе с нормальным весом, а у мужчин - в группе с ожирением ($r=0,73$; $p < 0,01$); у мужчин зрелого возраста I-го периода и у женщин зрелого возраста II-го периода активность аутофагии положительно коррелирует с тощей, мышечной массой и общим содержанием воды, а у пожилых мужчин отрицательно коррелирует с жировой массой.

3. Реакция аутофагии в ответ на оздоровительную программу и полную пищевую депривацию продолжительностью от 1 до 12 суток с последующим переходом на гипокалорийное питание характеризуется волнообразным течением процесса аутофагии с повышением активности у лиц, находившихся на полной пищевой депривации 4-6 и 11-12 суток, и снижением у лиц, находившихся на пищевой депривации 1 сутки и 7-10 суток; выявленная фазность, вероятно, связана с метаболическими перестройками в организме в процессе КОП.

4. Ограничение калорийности питания менее 800 ккал в сутки в комплексе с оздоровительными мероприятиями сопровождается благоприятными физиологическими реакциями и изменениями в липидном спектре, характеризующиеся активацией аутофагии у большинства обследованных и повышением концентрации ХС ЛПВП ($r= 0,66$; $p < 0,01$), а при потреблении более 800 и менее 1200 ккал в сутки - снижением концентрации триглицеридов ($r=-0,34$; $p < 0,05$).

5. Особенностью базовой аутофагии у пациентов с избыточной массой тела и сахарным диабетом 2-го типа является ее повышенная активность и слабо выраженная и разнонаправленная реакция на КОП; у лиц без сопутствующей патологии имеет место более низкая базовая активность, но выраженная реакция на проведение КОП.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В оценке базовой активности аутофагии у здоровых лиц разного возраста, пола и массы рекомендовано использовать полученные в работе данные о концентрации беклина-1 в качестве нормативных показателей.

2. Для получения эффекта активации аутофагии целесообразно ограничивать продолжительность комплекса восстановительной терапии и полной пищевой депривации в амбулаторных условиях до 4-5 суток, а в стационарных - до 11-12 суток.

3. С целью активации аутофагии и коррекции уровня ЛПВП и общего холестерина у женщин зрелого возраста можно рекомендовать комплекс оздоровительных мероприятий и гипокалорийную диету с суточной калорийностью 800-1200 ккал/сутки.

4. В лабораторной практике для оценки степени активации процесса аутофагии в условиях воздействия физиологических оздоравливающих факторов рекомендовано использовать показатель «дельта-беклин-1».

5. Для лиц с ИМТ от 25 до 30 кг/м² рекомендуется диета с калорийностью питания от 800 до 1200 ккал 1 раз в год, в случае неудержания веса - 2 раза в год (каждые 6 месяцев), лицам с ИМТ от 30 до 40 кг/м² – полная пищевая депривация, лицам с ИМТ выше 40 кг/м² рекомендуется диета до 800 ккал/сутки 3 раза в год с периодичностью 1 раз в 4 месяца.

6. Лицам с избыточной массой тела и ожирением, страдающим сахарным диабетом 2-го типа, рекомендовано применение комплексной оздоровительной программы в сочетании с ограничением калорийности питания от 800 до 1200 ккал/сутки продолжительностью 12 дней, 2 раза в год при ИМТ от 25 до 30 кг/м² и 3 раза в год с ИМТ от 30 до 40 кг/м² с учетом тяжести заболевания и сопутствующей патологии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение возможности регуляции аутофагии с помощью различных комплексных оздоравливающих и диетических программ у лиц различной весовой категории, возраста, гендерной принадлежности и сопутствующей патологией. Перспективным представляются исследования по изучению влияния отдельных физиологических факторов (физическая нагрузка, питьевой режим, очистительные процедуры и др.) на активность аутофагии. Кроме того, представляет большой интерес изучение активности аутофагии в сопоставлении с изменением функциональных и клинико-биохимических показателей гомеостаза организма человека. Важным элементом в этих исследованиях явится установление молекулярных механизмов регуляции аутофагии у человека. При этом планируется установить не только положительные стороны активации аутофагии, но и возможные отрицательные эффекты.

Полученные данные позволят предложить варианты регуляции активности аутофагии с помощью физиотерапевтических факторов, что будет иметь важное практическое значение в восстановительной медицине.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

Изобретения:

1. «Способ оздоровления человека». Патент №2656510, RU, рег. 5 июня 2018г. (Авторы: Даутов Ю.Ю., Лысенков С.П., Уракова Т.Ю., Тхакушинов Р.А., Тхакушинов И.А.).

2. «Способ активации аутофагии у человека». Патент №2781901, RU, рег.19.10.2022г. (Авторы: Лысенков С.П. Тхакушинов И.А., Даутов Ю.Ю., Уракова Т.Ю., Муженя Д.В., Тугуз А.Р., Уракова Д.М.).

Опубликованные работы:

1. Тхакушинов И.А. Способ оздоровления человека. Реферат патента №2656510, RU, опубликован: 05.06.2018, Бюл. №16. (Даутов Ю.Ю., Лысенков С.П., Уракова Т.Ю., Тхакушинов Р.А., Тхакушинов И.А.).

2. Тхакушинов И.А. Способ активации аутофагии у человека. Реферат патента №2781901, RU, опубликован 19.10.2022, Бюл. №29 (Лысенков С.П. Тхакушинов И.А., И.А., Даутов Ю.Ю., Уракова Т.Ю., Муженя Д.В., Тугуз А.Р., Уракова Д.М.).

3. Тхакушинов И.А. Оценка процесса аутофагии у мужчин разной массы в различные возрастные периоды / Тхакушинов И.А. // Национальная ассоциация ученых. – Санкт-Петербург, 2021. - №68. – С. 7-12.
4. Тхакушинов И.А. Оценка процесса аутофагии у женщин разной массы в различные возрастные периоды / Тхакушинов И.А. // Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы науки и образования». – Майкоп, 2021. - №1. – С. 102-105.
5. Тхакушинов И.А. Взаимосвязь аутофагии и жировой массы в условиях ограничения калорийности питания / Тхакушинов И.А., Лысенков С.П. // Материалы XXXVI Всероссийская научно-практическая конференция «Образование – Наука – Технологии». – Майкоп, 2021. – С. 134-138.
6. Тхакушинов И.А. Особенности активности аутофагии у женщин в зависимости от массы и возраста / Тхакушинов И.А., Лысенков С.П. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – Москва, 2021. - №5. – С. 30-35.
7. Тхакушинов И.А. Физиологическая активность аутофагии при ограничении калорийности питания у мужчин / Тхакушинов И.А., Лысенков С.П. // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Серия Биология. Химия. – Симферополь, 2021. – Том 7(73), №3. – С. 220-229.
8. Тхакушинов И.А. Аутофагия у лиц мужского пола и морфофизиологические показатели при частичной пищевой депривации / Тхакушинов И.А., Лысенков С.П. // Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Проблемы фундаментальной медицины». – Кемерово, 2021. – С. 211-213.
9. Tkhakushinov I.A. Identification of factors connected with autophagy activity under conditions of partial nutritional deprivation in men / Tkhakushinov I.A., Lysenkov S.P. // European journal of natural history. – 2022. - №2. – P.9-12.
10. Тхакушинов И.А. Гендерные и возрастные особенности активности аутофагии у здоровых лиц / Тхакушинов И.А., Лысенков С.П. // Современные вопросы биомедицины. Modern issues of biomedicine. – 2022. – Т.6(1). – С.225-229 **(рекомендовано ВАК РФ)**.
11. Тхакушинов И.А. Реакция аутофагии при полной пищевой депривации у человека / Тхакушинов И.А., Лысенков С.П. // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Серия Биология. Химия. - Симферополь, 2022.-Том 8(74), №2.- С.218-227.
12. Тхакушинов И.А. Реакция аутофагии на применение комплексной оздоровительной программы / Тхакушинов И.А., Корчажкина Н.Б., Лысенков С.П. // Журнал «Физиотерапевт». – Москва, 2023. - №3(159). – С.71-82 **(рекомендовано ВАК РФ)**.
13. Тхакушинов И.А. Активность аутофагии у пациентов с сахарным диабетом типа-2 и гипертонической болезнью в условиях проведения комплексной оздоровительной программы / Тхакушинов И.А., Корчажкина Н.Б., Лысенков С.П. // Журнал «Курортная Медицина». – Пятигорск, 2023. – №2. – С.106-116 **(рекомендовано ВАК РФ)**.

Список сокращений и условных обозначений:

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения;
ИМТ – индекс массы тела;
ЛИИ – лейкоцитарный индекс интоксикации;
ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности;
ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности;
КОП – комплексная оздоровительная программа;
ОХ – общий холестерин;
РДТ – разгрузочно-диетическая терапия;
ТГ – триглицериды;
Becn1 – белок беклин-1, маркер активности аутофагии;
MTORC1 – мишень рапамицина млекопитающих;
SIRT1 – белок сиртуин 1, сенсор энергетического обеспечения клетки.