

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК 2016 № 3

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК 2016 № 3

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 2004 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

ЗМЕСТ

От редакции..... 4

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Пашковская И. Д., Рушкевич Ю. Н., Лихачев С. А. Про- и антиоксидантная системы крови у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом	5
Байко С. В., Сукало А. В. Белки системы комплемента C3, C4 и NGAL – факторы тяжести почечного повреждения у детей с гемолитико-уремическим синдромом	13
Ильясевич И. А., Сошникова Е. В., Мазуренко А. Н., Васько О. Н., Криворот К. А. Оценка информативности электрофизиологических параметров в диагностике нарушений функций спинного мозга	20
Ревтович М. Ю., Шмак А. И., Красько О. В., Смолякова Р. М. Протеин тирозинфосфатазы в прогнозировании перитонеальной диссеминации у пациентов с резектабельным раком желудка	28
Абельский Д. Е. Сравнение результатов операции фемто-ЛАСИК по стандартному и персонализированному по значениям аберраций высших порядков протоколам абляции	35
Бонь Е. И., Островская О. Б., Зиматкин С. М. Ультраструктура нейронов фронтальной коры мозга 20-суточных крысят после антенатальной алкоголизации	43
Шулейко А. Ч., Воробей А. В., Новаковская С. А., Арчакова Л. И. Ультраструктурная перестройка тканей поджелудочной железы при хроническом панкреатите	47
Баровская Ю. А., Стеганцева М. В., Кустанович А. М., Савицкая Т. В., Алейникова О. В. Влияние молекулярно-генетических изменений на прогноз при остром миелоидном лейкозе у детей	57
Леонова Т. А., Безлер Ж. А., Митюкова Т. А., Кохан С. Б., Лузина Е. Б., Писаренко А. М., Кондратович В. А. Сердечный ритм у пациентов при лечении супрессивными дозами левотироксина.....	65

Чушова Н. В. Сравнительный анализ эффектов кратковременного и длительного электромагнитного облучения (1800 МГц) на репродуктивную систему крыс-самцов	74
Белоновская Е. Б., Лукивская О. Я., Нарута Е. Е., Кирко С. Н., Абакумов В. З., Кузьмицкая И. А., Буко В. У. Гепатопротективный эффект C ₂₃ -производного урсодезоксихолевой кислоты при экспериментальном неалкогольном стеатогепатите у крыс.....	80
Суходольский П. А., Пухов Д. Н., Зиматкин С. М. Динамика морфологических нарушений в мозжечке крыс после хронической антенатальной алкоголизации.....	86
Гайшун Е. И., Гайшун И. В., Пристром А. М. Способ оценки «биологического возраста» артерий как одного из факторов старения организма.....	93
Киселёв Л. П., Савицкая Т. В., Липай Н. В., Алейникова О. В. Экспрессия факторов ангиогенеза в саркомах у детей	99

АГЛЯДЫ

Шахбазов А. В. Нейроиндуцированные мезенхимальные стволовые клетки в терапии заболеваний нервной системы	107
Пронько П. С. Влияние потребления алкоголя на риск развития метаболического синдрома	117
Правила для авторов	126

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2016 № 3

Серия медицинских наук

На русском, белорусском и английском языках

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 393 от 18.05.2009

Тэхнічны рэдактар *В. А. Тоўстая*
Камп'ютарная вёрстка *М. Э. Малярэвіч*

Здадзена ў набор 28.07.2016. Падпісана ў друк 12.08.2016. Выхад у свет 26.08.2016. Фармат 60×84¹/₈.
Папера афсетная. Друк лічбавы. Ум. друк. арк. 14,88. Ул.-выд. арк. 16,4. Тыраж 58 экз. Заказ 158.
Кошт нумару: індывідуальная падпіска – 10,28 руб.; ведамасная падпіска – 25,21 руб.

Выдавец і паліграфічнае выкананне:

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецкі дом «Беларуская навука». Пасведчанне аб дзяржаўнай
рэгістрацыі выдаўца, вытворцы, распаўсюджвальніка друкаваных выданняў № 1/18 ад 02.08.2013.
ЛП № 02330/455 ад 30.12.2013. Вул. Ф. Скарыны, 40, 220141, Мінск.

© Выдавецкі дом «Беларуская навука»
Весці НАН Беларусі. Серыя медыцынскіх навук, 2016

PROCEEDINGS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICINE SERIES 2016 N 3

FOUNDER IS THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

The Journal has been published since January 2004

Issued four times a year

CONTENTS

From the editors	4
CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE	
Pashkouskaya I. D., Rushkevich Y. N., Likhachev S. A. Blood pro- and antioxidant system in patients with amyotrophic lateral sclerosis.....	5
Baiko S. V., Sukalo A. V. Complement proteins C3, C4 and NGAL are the factors of the severity of kidney damage in children with the hemolytic-uremic syndrome	13
Ilyasevich I. A., Soshnikova E. V., Mazurenko A. N., Vasko O. N., Krivorot R. A. Evaluation of the descriptiveness of electrophysiological parameters in the diagnosis of spinal cord disorders	20
Reutovich M. Yu., Shmak A. I., Krasko O. V., Smolyakova R. M. Protein tyrosine phosphatase in the prediction of peritoneal dissemination in patients with resectable gastric cancer	28
Abelski D. Standard and customized wavefront-guided femto-LASIK results comparison	35
Bon E. I., Ostrovskaya O. B., Zimatkin S. M. Ultrastructure features of the neurons of the frontal cortex of 20-day-old rats after antenatal alcoholization	43
Shuleika A. Ch., Varabei A. V., Novakovskaya S. A., Archakova L. I. Ultrastructural restructuring the pancreatic tissue in chronic pancreatitis.....	47
Barouskaya Yu. A., Stegantseva M. V., Kustanovich A. M., Savitskaya T. V., Aleinikova O. V. Effect of molecular genetic changes on the prognosis in case of acute myeloid leukemia in children	57
Leonova T. A., Bezler Zh. A., Mityukova T. A., Kohan S. B., Luzina E. B., Pisarenko A. M., Kondratovich V. A. Heart rate of patients treated with suppressive levothyroxine doses	65
Chueshova N. V. Comparative analysis of the effects of short and long electromagnetic radiation (1800 MHz) on the reproductive system of male rats.....	74
Belonovskaya E. B., Lukivskaya O. Y., Naruta E. E., Kirko S. N., Abakumov V. Z., Kuzmitskaya I. A., Buko V. U. Hepatoprotective effect of the C ₂₃ -derivative of the ursodeoxycholic acid in experimental nonalcoholic steatohepatitis of rats	80
Sukhadolski P. A., Pukhau D. N., Zimatkin S. M. Dynamics of morphological changes in the rat cerebellum after chronic prenatal alcohol exposure.....	86
Gaishun E. I., Gaishun I. V., Prystrom A. M. Method of assessment of the “biological age” of arteries as one of the factors of organism ageing.....	93
Kisialeu L., Savitskaia T., Lipai N., Aleinikova O. Expression of the angiogenesis factors of sarcoma in children	99
SURVEYS	
Shakhbazov A. V. Neuro-induced mesenchymal stem cells in the treatment of nervous system diseases	107
Pronko P. S. Effect of alcohol consumption on the risk of metabolic syndrome	117
Rules for the authors	126

ОТ РЕДАКЦИИ

Уважаемые авторы и читатели журнала!

Спасибо, что вы с нами и что высокий научный уровень ваших публикаций делает наше издание интересным и востребованным.

Со своей стороны редакция также стремится не останавливаться на достигнутом и предпринимает все возможное, чтобы журнал развивался и был современным.

Вы уже знаете, что «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук» входят в «Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований».

В 2015 г. журнал был включен в базу данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ). Теперь вы имеете возможность с помощью инструментов и сервисов, доступных для вас на платформе eLIBRARY.RU (раздел «Личный кабинет»), самостоятельно корректировать список своих публикаций и цитирований в РИНЦ, следить за анализом своей публикационной активности и т. д.

В этом году нами предприняты шаги по включению журнала в глобальный индекс цитирования Scopus, что расширит возможности представления исследований белорусских ученых для мировой научной общественности и повысит показатели цитируемости наших авторов. В связи с этим изменяются требования к оформлению статей, которые направляются для опубликования. С новыми «Правилами для авторов» вы можете ознакомиться либо в конце журнала, либо на сайте belnauka.by.

Надеемся на плодотворное сотрудничество!

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

УДК 616.15:616.832.522

И. Д. ПАШКОВСКАЯ, Ю. Н. РУШКЕВИЧ, С. А. ЛИХАЧЕВ

ПРО- И АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БОКОВЫМ АМИОТРОФИЧЕСКИМ СКЛЕРОЗОМ

*Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии,
Минск, Беларусь, e-mail: irenapass@mail.ru*

Изучены показатели про-, антиоксидантной систем крови у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (БАС) в зависимости от формы дебюта БАС и длительности заболевания. У лиц с наиболее тяжелой бульбарной формой БАС и длительностью его менее 1 года зафиксировано значимое повышение концентрации продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-П), и снижение активности супероксиддисмутазы (СОД); у пациентов с шейно-грудной формой БАС и длительностью заболевания от 1 до 4 лет выявлены активация вторичных процессов ПОЛ и значимое снижение активности не только СОД, но и каталазы. Установлена прямая корреляция между активностью СОД и функциональной шкалой неврологического дефицита (ALSFRS-R), причем только в случае длительности заболевания менее 1 года. Показана высокая диагностическая специфичность изученных показателей про-, антиоксидантной систем крови у пациентов с БАС (ТБК-П – 84 %, СОД и каталазы – 80 %) при недостаточной диагностической чувствительности.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

I. D. PASHKOUSKAYA, Y. N. RUSHKEVICH, S. A. LIKHACHEV

BLOOD PRO- AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Republican Scientific and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Belarus, e-mail: irenapass@mail.ru

It has been investigated the state of blood pro- and antioxidant system at patients with different form and duration of the amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Diagnosis of ALS were determined by revised El Escorial criteria and Awaji criteria. We assessed the catalase, superoxidodismutase (SOD) activity and products reacting with thiobarbituric acid (TBA-P) concentration of 82 patients and 25 healthy volunteers. It has been shown that patients with the most malignant form of bulbar ALS and shorter than 1 year, recorded a significant increase in the concentration of TBA-P and the decrease in the activity of SOD; in patients with cervical-thoracic form of ALS, and the disease duration from 1 to 4 years revealed the activation of secondary lipid peroxidation processes and a significant reduction in the activity not only of SOD and catalase. A direct correlation between the activity of SOD and functional neurological deficit scale (ALSFRS-R), but only in case of disease duration less than 1 year. It was shown the high diagnostic specificity of the studied the parameters blood pro- antioxidant system in patients with ALS but lower diagnostic sensitivity.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, lipid per oxidation, antioxidant system.

Введение. Изучение патогенеза бокового амиотрофического склероза (БАС) и поиск причин избирательной гибели мотонейронов при этой патологии остаются достаточно актуальными проблемами современной неврологии. Основными факторами развития этого крайне тяжелого заболевания являются установление мутантного гена супероксиддисмутазы (СОД-1), характерного для семейной формы БАС, для спорадического БАС выдвинуты гипотезы токсичности глутамата, неконтролируемого поступления Ca^{++} в нейрон, свободнорадикального окисления, недостаточность нейротрофического фактора, изменения цитоскелета и активация

апоптоза [1, 2]. Как известно, болезнь двигательного нейрона (БДН) начинается задолго до ее клинических проявлений, так как гибель менее 80 % мотонейронов не проявляется ввиду огромных компенсаторных реиннервационных возможностей этих клеток [3]. По-видимому, гетерогенность молекулярной биологии мотонейронов не только в разных отделах ЦНС, но и на уровне одного сегмента или ядра может определять избирательность поражения той или иной популяции нейронов, наличие разных форм и вариантов течения данной патологии.

Согласно современным данным, интенсификация свободнорадикального окисления является неспецифическим процессом и развивается в ответ на действие повреждающих факторов различной природы, сопровождается повреждением биологических мембран клеток и внутриклеточных фракций, коррелирует с уровнем аутоинтоксикации. Степень активации мембранодеструктивных процессов определяет тяжесть течения заболевания и зависит от состояния антиоксидантной защиты организма [4]. При патологическом состоянии избыточная активация свободнорадикальных процессов служит одним из механизмов повреждения митохондрий, которые сами являются важным источником кислородных радикалов. Это сопровождается нарушением процессов электронного транспорта, снижением продукции АТФ, активацией механизмов программированной гибели клетки, включая апоптоз, аутофагию и некрозоподобные изменения [5].

К быстро прогрессирующей форме БДН относится БАС, к развитию которого приводят мутации в гене медь-цинк-зависимой СОД-1 – антиоксидантного фермента, утилизирующего свободные радикалы [3, 6]. В связи с отсутствием корреляции между изменением генотипа и активностью фермента многими авторами высказывалось мнение о том, что развитие БДН, скорее всего, связано с неким новым цитотоксическим свойством мутантной молекулы белка СОД. Возможно, окислительное повреждение белковых молекул может облегчать и ускорять их совместную агрегацию, формирование цитоплазматических включений, которые служат субстратом для дальнейших патобиохимических окислительных реакций [7]. В результате происходит усиление пероксидантных реакций и возрастает продукция токсичных гидроксильных радикалов. Метаболиты O_2 и вторичные продукты ПОЛ усиливают эксайтотоксичность, нарушая систему обратного захвата глутамата и блокируя ряд ферментных систем утилизации нейротрансмиттера, что образует замкнутую цепь патологических реакций в нервной системе [1].

Цель работы – изучить особенности про-, антиоксидантной систем крови у пациентов с разными формами дебюта бокового амиотрофического склероза и длительностью заболевания.

Материалы и методы исследования. Всего обследовано 82 пациента с установленным диагнозом БАС, которые были госпитализированы в неврологические отделения РНПЦ неврологии и нейрохирургии в период с 2012 по 2015 г. Диагноз БАС основывался на анализе клинико-электронейромиографических данных по уточненным Эль-Эскориальским критериям с алгоритмом Awaji-Shima: наличие у пациента признаков сочетанного поражения центральных и периферических мотонейронов на трех уровнях из четырех возможных (ствол мозга, шейный, грудной и поясничный отделы спинного мозга), а также неуклонно прогрессирующее течение заболевания, констатированное при динамическом наблюдении в течение 6 мес. [8, 9].

Оценка функционального состояния пациентов проводилась по шкале нарушений функции при БАС (ALSFRSR – Amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale revised) [10]. У лиц, включенных в исследование, неврологический дефицит по шкале ALSFRSR варьировался от 24 до 48 баллов (в среднем $38,2 \pm 4,6$ балла).

В зависимости от первичного уровня поражения выделено три группы с различными формами БАС согласно ранее предложенным классификациям [11, 12]. Бульбарная форма БАС диагностирована у 37 (45,1 %) пациентов (12 мужчин, 25 женщин) в возрасте 60 (53–66) лет; шейно-грудная – у 33 (40,3 %) пациентов (17 мужчин, 16 женщин), медиана возраста составила 59 (53–64) лет; пояснично-крестцовая – у 12 (14,6 %) пациентов (7 мужчин, 5 женщин) в возрасте 51 (48,5–59) года.

Все пациенты были разделены также на подгруппы в зависимости от длительности заболевания. Длительность до 1 года отмечена у 53 (64,6 %) пациентов, медиана возраста 55,0 (52,0–64,0) года, средняя продолжительность БАС – $8,3 \pm 2,3$ мес. Длительность заболевания от 1 года до

4 лет наблюдалась у 29 (35,4 %) пациентов, медиана возраста 54,5 (51,0–62,0) года), средняя продолжительность заболевания – $16,6 \pm 3,3$ мес.

Контрольную группу составили 25 практически здоровых добровольцев (10 мужчин, 15 женщин), медиана возраста – 45 (39,2–62,3) лет. Пациенты контрольной группы и пациенты с БАС были сопоставимы по возрасту и полу.

Забор крови производили из кубитальной вены, натощак, однократно на 1-й либо 2-й день после госпитализации. Активность процессов ПОЛ в плазме крови определяли по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-П), по методике, модифицированной В. А. Костюком [13]. Активность СОД в цельной крови изучали по реакции супероксидзависимого окисления кверцетина [14]. Активность каталазы в плазме крови исследовали методом комплексообразования с солями молибдена [15]. Показатели про-, антиоксидантной систем крови определяли на спектрофотометре РV1251С производства Республики Беларусь.

При статистической обработке полученных данных применяли программу Statistica 6.0. Результаты описывали в виде медианы (Me) и интервала между 25-м и 75-м перцентилями либо в виде средней арифметической и стандартного отклонения. Различия между тремя и более группами устанавливали с помощью критерия множественных сравнений Крускала–Уоллиса. Для сравнения двух независимых выборок использовали критерий Манна–Уитни. Корреляционную взаимосвязь между двумя признаками анализировали с помощью критерия Спирмена с вычислением коэффициента корреляции. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Концентрация ТБК-П в плазме крови определена у 82 пациентов с БАС и у 25 практически здоровых добровольцев. Как видно из рис. 1, содержание ТБК-П у обследованных пациентов с БАС составило 2,46 (1,92–2,9) мкмоль/л, что было достоверно выше ($p = 0,0006$), чем в группе практически здоровых лиц, – 1,8 (1,6–2,15) мкмоль/л.

Активность антиоксидантного фермента СОД в цельной крови обследованных изменялась от 41,8 до 132,0 Е/мл, а у 57 (70,0 %) пациентов была ниже значений медианы здоровых лиц (98,8 Е/мл) .

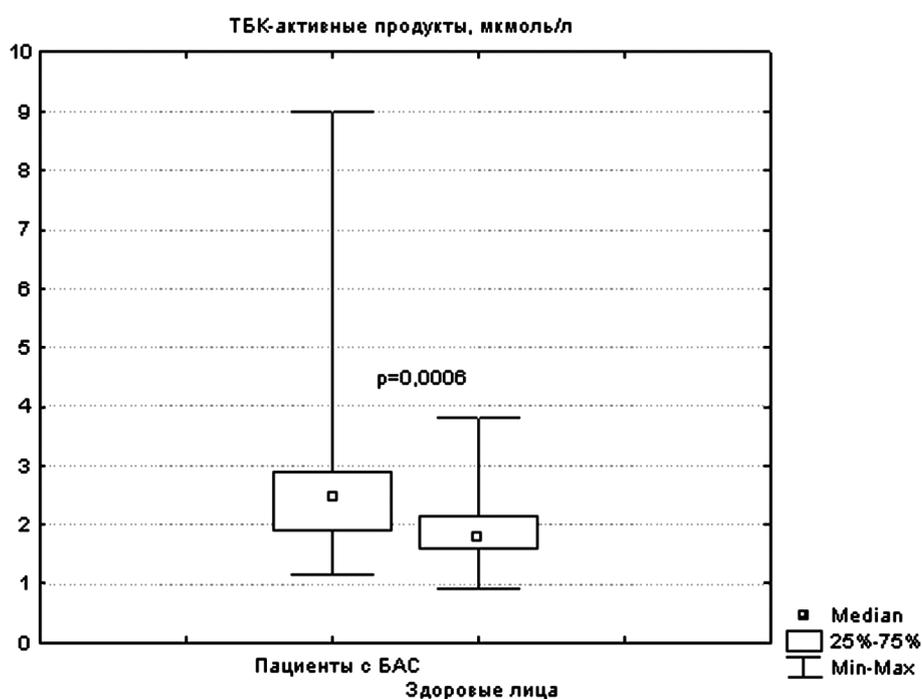


Рис. 1. Концентрация ТБК-П у пациентов с БАС и у здоровых лиц; p – достоверность различий по сравнению с данными здоровых лиц

Подобные изменения выявлены при исследовании активности каталазы в плазме крови: у 55 (67,1 %) пациентов регистрировали низкую активность этого фермента, в остальных случаях изменения были разнонаправлены: у 14 (17,1 %) пациентов отмечали более чем двукратное повышение относительно нормы, у 13 (15,8 %) этот показатель был на уровне нормальных значений.

Активность ферментов антиоксидантной системы – СОД и каталазы в крови пациентов с БАС в сравнении с данными здоровых добровольцев (контроль) представлены в табл. 1.

Таблица 1. Активность ферментов антиоксидантной системы крови у пациентов с БАС, Ме (25–75 процентиля)

Показатель	Пациенты с БАС (n = 82)	Контроль (n = 25)	Критерий Манна-Уитни
СОД, Е/мл	83,2 (67,7–103,0)	98,8 (85,4–114,4)	$p = 0,009$
Каталаза, усл. ед/с·мл	16,8 (10,8–29,7)	22,2 (17,4–28,8)	$p = 0,043$

Примечание. p – достоверность различий по сравнению с данными контрольной группы, n – количество человек.

При БАС выявлено однонаправленное уменьшение активности изученных ферментов антиоксидантной системы – достоверное снижение активности каталазы и СОД, что, возможно, связано с частичным ингибированием ферментов продуктами апоптотической гибели клеток и перекисно-модифицированными токсическими субстанциями альдегидной природы, характерными для нейродегенеративного процесса. В норме СОД обеспечивает обезвреживание супероксидного анион-радикала, что приводит к образованию перекиси водорода – H_2O_2 , для разложения которой необходима достаточная активность каталазы. При существенном угнетении активности каталазы происходит накопление H_2O_2 , что может стать причиной образования более агрессивных активных форм кислорода и усугубить течение патологического процесса в очаге повреждения нервной ткани. Учитывая роль каталазы в процессах оксигенации [16], ее низкая активность может характеризовать состояние гипоксии в тканях, когда происходит накопление перекиси водорода, которая является источником гидроксильных радикалов, образуются гидроперекиси липидов и происходит окислительная модификация белков нервной ткани. С изменением цитоскелетных белков связывают нарушения аксонального транспорта, особенно медленного антеградного и быстрого ретроградного [17].

Установленный про-, антиоксидантный дисбаланс в группе пациентов с БАС способствует накоплению токсических субстратов для этих ферментов – супероксидного анион-радикала, перекиси водорода. Данные изменения могут быть причиной образования более агрессивных активных форм кислорода с дальнейшим оксидантным повреждением клеточных мембран в нервной ткани.

Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым активность цитозольной СОД-1, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы у пациентов с БАС снижается [18].

С целью определения диагностической значимости исследуемых показателей крови (ТБК-П, СОД и каталаза), используемых для оценки выраженности дисбаланса про-, антиоксидантной систем у пациентов с БАС, рассчитаны чувствительность и специфичность данных показателей (табл. 2).

В качестве пороговых выбраны следующие значения медианы: для ТБК-П – 2,46 мкмоль/л, для СОД – 83,2 Е/мл, для каталазы – 16,8 усл. ед/с·мл.

Таблица 2. Критерии диагностической значимости показателей про-, антиоксидантной систем крови у пациентов с БАС

Показатель	ДЧ, %	ДС, %	ДЭ, %	ПЦ+, %	ПЦ-, %
ТБК-П	46,3	84,0	55,2	90,2	32,8
СОД	50,0	80,0	57,1	88,8	33,3
Каталаза	45,0	80,0	53,3	87,8	31,3

Примечание. ДЧ, ДС, ДЭ – диагностическая чувствительность, специфичность и эффективность соответственно, ПЦ+ и ПЦ- – предсказательная ценность положительного и отрицательного результатов.

Как показано в табл. 2, все изученные показатели про-, антиоксидантной систем крови (ТБК-П, СОД и каталаза) у пациентов с БАС имели достаточно высокие значения ДС – 80 % и более. Значения ПЦ+ данных тестов составляли 90,2; 88,8 и 87,8 % соответственно, но по остальным позициям данные показатели не имели достаточной лабораторно-диагностической значимости (менее 60 %).

Следовательно, анализ показателей про-, антиоксидантного состояния крови у пациентов с БАС выявил достоверное увеличение ($p = 0,0006$) концентрации ТБК-активных продуктов в плазме крови на фоне недостаточности эндогенной антиоксидантной системы в виде снижения активности СОД ($p = 0,009$) и каталазы ($p = 0,043$) по сравнению с данными контрольной группы, что может являться важным диагностическим критерием повреждений нервной ткани, вызванным окислительным стрессом. Изученные показатели про-, антиоксидантной систем крови у пациентов с БАС являются высокоспецифичными тестами (ТБК-П – 84 %, СОД и каталазы – 80 %), которые редко дают положительный результат при отсутствии заболевания, но недостаточно чувствительными.

Проведен анализ изучаемых показателей крови у пациентов с разными формами БАС.

При бульбарной форме заболевание начиналось с замедления речи, нарушения глотания вследствие вовлечения в патологический процесс ядер каудальной группы черепных нервов ствола мозга, затем присоединялась мышечная слабость в конечностях и туловище.

У пациентов с БАС при шейно-грудной форме заболевание начиналось с асимметричного вовлечения верхних конечностей, чаще неловкостью при выполнении мелких движений пальцами, похуданием кистей и фасцикуляциями. Крампи предшествовали развитию мышечной слабости у всех пациентов.

При пояснично-крестцовом дебюте БАС обычно первыми подвергались поражению разгибатели стопы, что проявлялось «свисающей стопой» и походкой типа степпаж (пациент высоко поднимает ногу и выбрасывает ее вперед, резко опуская). В неврологическом статусе у всех пациентов отмечались смешанные парезы: сочетание высоких и патологических сухожильно-периостальных рефлексов с гипотрофией конечностей, чаще кистей.

Содержание вторичных продуктов ПОЛ, активность ферментов антиоксидантной системы (СОД и каталазы) у пациентов с различными формами БАС в сравнении с данными здоровых добровольцев представлены в табл. 3.

При множественном сравнении по критерию Крускала–Уоллиса анализ полученных данных показал, что повышение содержания ТБК-активных продуктов ($p = 0,0007$) и снижение активности СОД ($p = 0,021$) у пациентов с БАС зарегистрировано при всех формах дебюта заболевания. При попарном сравнении в наибольшей степени отличались от контроля значения ТБК-П ($p_1 = 0,035$) и СОД ($p_1 = 0,0027$) у пациентов с бульбарной формой БАС. При шейно-грудной форме БАС выявлено достоверное снижение активности каталазы ($p_1 = 0,04$) и повышение концентрации ТБК-П ($p_1 = 0,0007$). При пояснично-крестцовой форме активность ферментов антиоксидантной защиты не была снижена относительно таковой в контрольной группе.

Т а б л и ц а 3. Показатели про-, антиоксидантного состояния крови у пациентов с различными формами БАС, Me (25–75 процентиля)

Показатель	Бульбарная форма БАС ($n = 37$)	Шейно-грудная форма БАС ($n = 33$)	Пояснично-крестцовая форма БАС ($n = 12$)	Контроль ($n = 25$)	Критерий Крускала–Уоллиса
ТБК-П, мкмоль/л	2,1 (1,9–2,7) $p_1 = 0,035$	2,5 (2,1–2,9) $p_1 = 0,0007$	3,2 (2,2–3,6) $p_1 = 0,001$	1,8 (1,6–2,2)	$p = 0,0007$
СОД, Е/мл	79,8 (60,9–93,8) $p_1 = 0,0027$	87,2 (75,1–106,0)	79,8 (67,8–117,2)	98,8 (85,4–114,4)	$p = 0,021$
Каталаза, усл. ед/с·мл	18,3 (10,8–29,4)	16,5 (11,4–27,0) $p_1 = 0,04$	13,2 (7,8–34,5)	22,2 (17,4–28,8)	$p = 0,22$

П р и м е ч а н и е. p_1 – различие при попарном сравнении с контролем (критерий Манна–Уитни), n – количество человек.

Таким образом, наиболее выраженные изменения в про-, антиоксидантных системах крови выявлены в подгруппе пациентов с бульбарной формой заболевания ($n = 37$). Только в этой подгруппе активность СОД была достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p_1 = 0,0027$) на фоне высокой концентрации ТБК-П, что, возможно, указывает на вклад угнетения активности СОД в развитие наиболее злокачественной, бульбарной, формы БАС. Достоверное снижение активности каталазы по сравнению с контролем установлено при шейно-грудной форме.

Далее изучали показатели про-, антиоксидантных систем крови в зависимости от длительности заболевания, а именно в группе пациентов с БАС, болеющих до 1 года. Оценка по функциональной шкале неврологического дефицита (ALSFRSR) в этих пациентов составила $38,4 \pm 5,8$ балла.

В группе пациентов, болеющих от 1 до 4 лет, оценка по функциональной шкале неврологического дефицита (ALSFRSR) составила $38,0 \pm 3,6$ балла.

Показатели содержания вторичных продуктов ПОЛ, активности ферментов антиоксидантной системы (СОД и каталазы) у пациентов с различной длительностью заболевания в сравнении с таковыми в контрольной группе представлены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Показатели про-, антиоксидантного состояния крови у пациентов с разной длительностью заболевания, Ме (25–75 перцентили)

Показатель	Длительность БАС		Контроль ($n = 25$)	Критерий Крускала–Уоллиса
	менее 1 года ($n = 53$)	1–4 года ($n = 29$)		
ТБК-П, мкмоль/л	2,4 (2,0–2,8) $p_1 = 0,008$	2,3 (1,9–3,1) $p_1 = 0,002$	1,8 (1,6–2,2)	$p = 0,004$
СОД, Е/мл	84,1 (63,8–103,5) $p_1 = 0,03$	79,4 (68,6–98,5) $p_1 = 0,015$	98,8 (85,4–114,4)	$p = 0,03$
Каталаза, усл. ед/с·мл	17,4 (11,4–33,6)	15,6 (10,2–30,0) $p_1 = 0,038$	22,2 (17,4–28,8)	$p = 0,14$

П р и м е ч а н и е. p_1 – различие при попарном сравнении с контролем (критерий Манна–Уитни), n – количество человек.

При сравнении пациентов с разной длительностью заболевания с группой контроля выявлено значимое повышение концентрации ТБК-П ($p = 0,004$) и снижение активности СОД ($p = 0,03$). При попарном сравнении в группе пациентов с длительностью заболевания от 1 до 4 лет обнаружено снижение активности каталазы ($p_1 = 0,038$) относительно контрольных данных, что указывает на существенное негативное влияние продолжительного нейродегенеративного процесса на активность основных ферментов антиоксидантной системы крови.

Проведение корреляционного анализа у пациентов с длительностью заболевания менее 1 года показало статистически значимую умеренную положительную корреляционную связь между активностью СОД в крови и оценкой состояния пациентов по шкале ALSFRSR ($r = 0,48$; $p = 0,013$). Данная шкала характеризует функциональные возможности (речь, ходьбу, самообслуживание, письмо и т. д.), а более высокий балл соответствует большим функциональным возможностям пациента. Более низкая активность фермента антиоксидантной защиты СОД указывает на прогрессирование и высокую активацию процессов ПОЛ и на дальнейшее повреждение мембранных структур клеток. Найденная корреляционная связь указывает на прямую зависимость между снижением активности СОД и ухудшением функционального состояния пациента с БАС при выявлении заболевания до 1 года (рис. 2).

Таким образом, у пациентов с БАС установлено нарушение равновесия в про-, антиоксидантных системах крови с активацией процессов ПОЛ и уменьшением активности СОД и каталазы. Существенное снижение ферментативного антиокислительного потенциала происходит при длительном течении заболевания, и, вероятно, усугубляет процесс нейродегенерации. Прямая корреляция активности СОД с функциональной шкалой неврологического дефицита (ALSFRSR) у пациентов с длительностью заболевания менее 1 года может указывать на то, что СОД, являясь

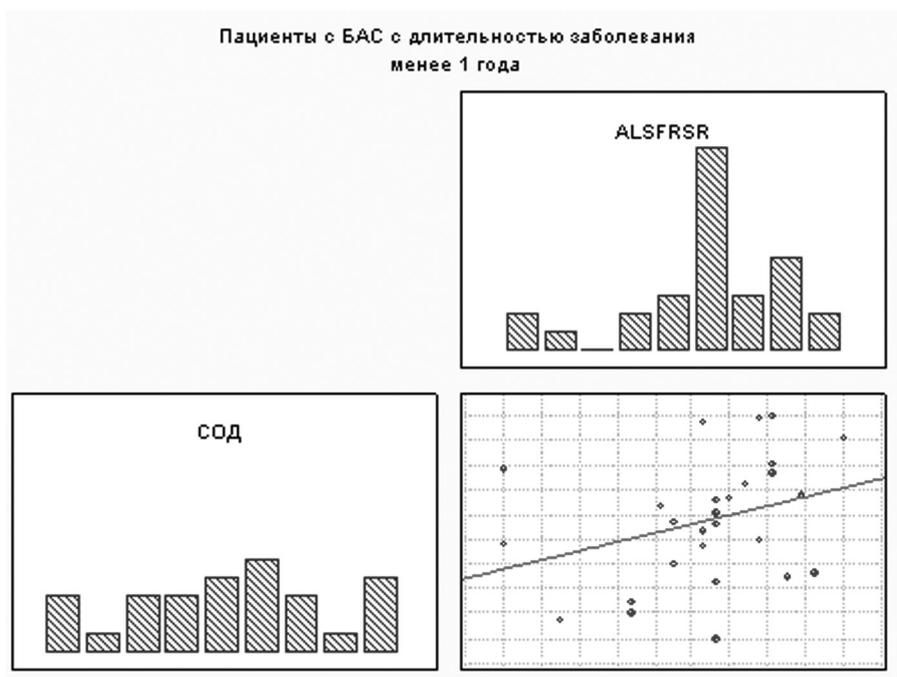


Рис. 2. Корреляция между активностью СОД и функциональным состоянием пациентов по шкале ALSFRSR при длительности заболевания до 1 года

основным ферментом антиоксидантной защиты клеток, отражает выраженность нейродегенерации на ранних этапах заболевания.

Заключение. Таким образом, при БАС установлен дисбаланс в про-, антиоксидантной системах крови в виде увеличения концентрации ТБК-П ($p = 0,0006$) и снижения активности ключевых антиоксидантных ферментов СОД ($p = 0,009$) и каталазы ($p = 0,043$) по сравнению с данными здоровых лиц, что может являться важным диагностическим критерием повреждений нервной ткани, вызванных окислительным стрессом. Изученные показатели про-, антиоксидантной систем крови у пациентов с БАС являются высокоспецифичными диагностическими тестами (ТБК-П – 84 %, СОД и каталазы – 80 %), которые редко дают положительный результат при отсутствии заболевания, но недостаточно чувствительны при данной патологии.

Наиболее выраженное снижение активности СОД зафиксировано у пациентов с бульбарной формой БАС, что, вероятно, является одним из факторов, определяющим тяжелое и быстрое течение нейродегенеративного заболевания. Наиболее отчетливое снижение активности каталазы наблюдается на 2–4-м году заболевания при шейно-грудной форме БАС, что может быть обусловлено длительным течением нейродегенеративного процесса и дальнейшим истощением системы антиоксидантной защиты.

У пациентов с длительностью заболевания менее 1 года показана прямая корреляционная зависимость между активностью СОД и функциональной шкалой неврологического дефицита (ALSFRSR), что указывает на важную роль СОД, основного фермента системы антиоксидантной защиты клеток, в развитии нейродегенерации уже на ранних этапах заболевания. Динамическое исследование показателей про-, антиоксидантной систем крови позволяет косвенно судить о течении и темпах прогрессирования нейродегенеративного процесса при БАС.

Список использованной литературы

1. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? / B. Halliwell // J. Neurochem. – 2006. – Vol. 97 (6). – P. 1634–1658.
2. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration / J. B. Shulz [et al.] // Eur. J. Biochem. – 2000 – Vol. 267. – P. 4904–4911.

3. *Mitsumoto, H.* Amyotrophic lateral sclerosis / H. Mitsumoto, D. A. Chad, E. P. Piore. – Philadelphia: F. A. Davis Company, 1998. – 480 p.
4. Свободнорадикальное окисление и сердечно-сосудистая патология: коррекция антиоксидантами / А. П. Голиков [и др.] // Лечащий врач. – 2003. – № 4. – С. 35–37.
5. *Friedlander, R. M.* Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases / R. M. Friedlander // N. Engl. J. Med. – 2003. – Vol. 348. – P. 1365–1375.
6. Молекулярные механизмы развития болезни двигательного нейрона / В. И. Скворцова [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2005. – Т. 102, № 4. – С. 68–76.
7. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders / A. Reynolds [et al.] // Int. Rev. Neurobiol. – 2007. – Vol. 82. – P. 297–325.
8. *Brooks, B. R.* Revised Criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases of World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases, El Escorial “Clinical Limits of ALS” Workshop Contributors (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis / B. R. Brooks // J. of the Neurol. Sci. – 1998. – Vol. 124. – P. 96–107.
9. Can Awaji ALS criteria provide earlier diagnosis than the revised El Escorial criteria? / T. Okita [et al.] // J. of the Neurol. Sci. – 2011. – Vol. 302 (1–2). – P. 29–32. – doi:10.1016/j.jns.2010.12.007.
10. *Cedarbaum, J.* Performance of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS) in multicenter clinical trials / J. Cedarbaum, N. Stambler // J. of the Neurol. Sci. – 1997. – Vol. 152 (1). – P. 1–9. – doi:10.1016/s0022-510x(97)00237-2.
11. *Хондариан, О. А.* Боковой амиотрофический склероз / О. А. Хондариан, Т. Л. Бунина, И. А. Завалишин. – М.: Медицина, 1978. – 264 с.
12. *Norris, F. H.* Onset, natural history and prognosis of adult motor neuron disease / F. H. Norris // J. of the Neurol. Sci. – 1993. – Vol. 118. – P. 48–55.
13. *Костюк, В. А.* Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью тиобарбитуровой кислоты в анаэробных условиях / В. А. Костюк, А. И. Потапович // Вопр. мед. химии. – 1987. – № 3. – С. 115–118.
14. *Костюк, В. А.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
15. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
16. *Сторожук, П. Г.* Ферменты прямой и косвенной антирадикальной защиты эритроцитов и их роль в инициации процессов оксигенации гемоглобина, антибактериальной защите и делении клеток / П. Г. Сторожук // Вестн. интенсив. терапии. – 2003. – № 3. – С. 8–13.
17. *Завалишин, И. А.* Боковой амиотрофический склероз / И. А. Завалишин, М. Н. Захарова // Неврол. журн. – 1998. – № 3. – С. 10–13.
18. *Васильев, А. В.* Клинико-биохимические особенности бокового амиотрофического склероза у лиц молодого возраста: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. В. Васильев. – М., 2008. – 30 с.

Поступила в редакцию 13.04.2016

УДК 616.61-008.6-053.2

С. В. БАЙКО¹, А. В. СУКАЛО^{1,2}

**БЕЛКИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА C3, C4 И NGAL –
ФАКТОРЫ ТЯЖЕСТИ ПОЧЕЧНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ
У ДЕТЕЙ С ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ**

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь, e-mail: baiko@yandex.ru

²Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: kafedra.pediatric@yandex.by

Цель работы – определить изменение уровней нейтрофильного желатиназо-ассоциированного липокалина (NGAL), белков системы комплемента C3, C4 в крови детей с гемолитико-уремическим синдромом (ГУС) и найти взаимосвязи между ними и факторами, определяющими тяжесть почечного повреждения. Проспективное исследование включало 159 детей: 35 – в острой фазе ГУС, 124 – перенесших ГУС не ранее чем через 6 мес. после выписки из стационара и 28 – практически здоровых детей. Обнаружено повышение NGAL у всех детей с ГУС, наиболее выраженное у нуждавшихся в заместительной почечной терапии. Выявлена активация альтернативного пути системы комплемента при ГУС Д «+», обусловленная снижением фракции C3 при нормальном уровне C4. Установлено, что между повышением NGAL и снижением комплемента C3 имеется тесная корреляционная связь с параметрами, отражающими тяжесть почечного повреждения.

Ключевые слова: гемолитико-уремический синдром, дети, нейтрофильный желатиназо-ассоциированный липокалин (NGAL), комплемент C3 и C4, острое почечное повреждение.

S. V. BAIKO¹, A. V. SUKALO^{1,2}

**COMPLEMENT PROTEINS C3, C4 AND NGAL ARE THE FACTORS OF THE SEVERITY
OF KIDNEY DAMAGE IN CHILDREN WITH THE HEMOLYTIC-UREMIC SYNDROME**

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus, e-mail: baiko@yandex.ru

²Belarusian National Academy of Sciences, Minsk, Belarus, e-mail: kafedra.pediatric@yandex.by

The purpose of this study was to determine changes of levels of blood neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), complement proteins C3 and C4 in children with hemolytic-uremic syndrome (HUS) and to find the relationship between them and factors determining the severity of renal damage. A prospective study included 159 children: 35 in the acute phase of HUS, 124 – after HUS, at least 6 months after discharge from the hospital and 28 healthy children. NGAL was elevated in all children with HUS more pronounced in those who required renal replacement therapy. Activation of the alternative pathway of the complement system in HUS D "+" due to reduced C3 and normal C4 levels was found. The degree of increasing NGAL and decreasing complement C3 has a close correlation with parameters reflecting the severity of renal damage.

Keywords: hemolytic uremic syndrome, children, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), complement C3 and C4, acute kidney injury.

Введение. Гемолитико-уремический синдром (ГУС) является наиболее частой причиной острой почечной недостаточности (ОПН) у детей раннего возраста. ГУС представляет собой клинико-лабораторный симптомокомплекс, включающий микроангиопатическую, неиммунную гемолитическую анемию, тромбоцитопению и ОПН [1].

В настоящее время ГУС подразделяется на две группы, в зависимости от наличия связи в этиологии заболевания с шига-токсин продуцирующими штаммами *E. coli* (STEC-ГУС), *Shigella dysenteriae* I типа или отсутствия таковой (атипичный ГУС; ГУС, вызванный *Streptococcus pneumoniae*; вторичный ГУС и др.). Первая группа заболеваний в структуре причин ГУС составляет 90–95 % и в подавляющем числе случаев развивается на фоне диареи, поэтому часто обозначается термином ГУС Д «+» (типичный, диарея-ассоциированный ГУС) до точного установления его этиологии [2, 3].

Острое почечное повреждение (ОПП) является неотъемлемой частью ГУС. Согласно рекомендациям KDIGO (Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury) по диагностике и лечению ОПП, опубликованным в 2012 г., нарушение фильтрационной функции почек оценивают по уровню креатинина сыворотки крови и динамике его нарастания, а также по степени снижения почасовой скорости мочеотделения [4]. Основным недостатком такого подхода является невозможность раннего выявления ОПП.

Диагностика ОПП по уровню креатинина затрудняется тем, что во многих случаях увеличение концентрации последнего происходит лишь через 24–48 ч после развития ОПП. Это связано с тем, что почки обладают значительным функциональным резервом, поэтому концентрация креатинина не изменяется до тех пор, пока не утрачено 60 % почечной паренхимы. Кроме того, повышение уровня креатинина в сыворотке крови может зависеть не только от функции почек, но и от других факторов, не связанных с системой выделения [5]. Именно поэтому в течение последних лет идет активный поиск биологических маркеров ранней диагностики ОПП, которые обладают большей чувствительностью и специфичностью, чем креатинин.

Идеальный биомаркер должен продуцироваться поврежденными клетками почек, а его уровень должен повышаться непосредственно сразу после повреждения почечной ткани, когда оно является обратимым. Это повышение должно быть пропорционально степени повреждения и снижаться вскоре после улучшения почечной функции. Данным требованиям соответствует нейтрофильный желатиназо-ассоциированный липокалин (NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, липокалин-2).

NGAL – белок с молекулярной массой 25 кДа. Первоначально он был выделен из супернатанта активированных нейтрофилов человека, однако позднее более детальные исследования показали, что NGAL может синтезироваться в разных органах и различными типами клеток (например, гепатоцитами, адипоцитами, клетками почечных канальцев и др.). Показано, что у здорового человека NGAL в крови определяется в небольшой концентрации в различных тканях или органах с активированными эпителиальными клетками [6, 7].

Повышение синтеза NGAL в клетках проксимальных канальцев обусловлено ишемией почечной паренхимы и ее поражением нефротоксическими соединениями. При ишемическом повреждении почек выработка NGAL в клетках канальцевого эпителия многократно увеличивается, возрастает его концентрация в крови и экскреция с мочой, опережая повышение уровня креатинина [8]. Концентрация NGAL как в моче, так и в сыворотке крови увеличивается пропорционально тяжести и длительности почечного повреждения [9].

К достоинствам NGAL можно отнести то, что его уровень достаточно быстро и просто измеряется в небольших количествах биологических жидкостей при помощи средств современного иммунохимического анализа, в частности иммуноферментного. Важность раннего выявления таких маркеров ОПП, как NGAL, не вызывает сомнения, поскольку открывает возможности для своевременного лечения ГУС.

Система комплемента является важным элементом врожденного иммунитета и активируется в результате иммунного ответа организма под действием как антител, относящихся к иммуноглобулинам классов IgG и IgM, так и бактериальных липосахаридов или других соединений. Активированные белки системы комплемента либо непосредственно разрушают патоген (киллерное действие), либо обеспечивают лучшее их поглощение фагоцитами (опсонизирующее действие), либо выполняют функцию хемотаксических факторов, привлекая в зону проникновения патогена клетки воспаления [10]. Механизмы активации системы комплемента достаточно хорошо описаны при многих заболеваниях, однако мало изучены у детей с постдиарейным ГУС.

Цель работы – оценить изменение уровней NGAL, белков системы комплемента C3, C4 в крови детей с гемолитико-уремическим синдромом, установить их диагностическую значимость и выявить взаимосвязи между ними и факторами, определяющими тяжесть почечного повреждения и исхода (уровнями лейкоцитов, аланинаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы крови в дебюте заболевания, длительностью анурии и нормализации уровней креатинина и др.).

Материалы и методы исследования. Проспективное, продольное исследование проводилось с 1 января 2013 г. по 31 декабря 2015 г. на базе Республиканского центра детской нефрологии

и почечной заместительной терапии (УЗ «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска). Обследовано 159 детей: основную группу составили 35 пациентов в остром периоде ГУС, группу сравнения – 124 человека, перенесших ГУС не ранее чем через 6 мес. после выписки из стационара, группу контроля – 28 практически здоровых детей. Обследование включало сбор данных анамнеза, анализ медицинской документации, клиническое наблюдение, лабораторные и инструментальные методы исследования.

Для изучения NGAL при диарея-ассоциированном ГУС выделено 4 группы пациентов: 1-я – дети в остром периоде ГУС без потребности в диализе ($n = 6$), медиана возраста 1,92 (1,33–6,67) года; 2-я – дети в остром периоде ГУС с необходимостью в диализной терапии ($n = 21$), медиана возраста 2,5 (1–9,42) года; 3-я – пациенты, переболевшие ГУС ($n = 60$), медиана возраста 6,4 (1,58–12,67) года, катамнез заболевания 4,13 (0,5–8,5) года; 4-я – практически здоровые дети ($n = 28$). Отдельно изучались уровни липокалина-2 при атипичном ГУС (аГУС): у мальчика (№ 1) в возрасте 6,67 года с развитием в остром периоде кровоизлияния в головной мозг и смертью, и девочки (№ 2) в возрасте 7,42 года с геморрагическим инсультом при поступлении в диализный центр (ДЦ) и исходом в терминальную почечную недостаточность. Оба ребенка находились на лечении гемодиализом. Проведен забор образцов сывороток крови в 4 основных точках: точка 1 – поступление в ДЦ, точка 2 – восстановление нормального уровня тромбоцитов, точка 3 – достижение адекватного диуреза (более 1 мл/кг/ч), точка 4 – нормализация уровней креатинина крови. Определение уровней NGAL крови осуществляли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов Human Lipocalin-2 / NGAL (ELISA), R&D Systems (США).

С целью оценки изменения уровней белков системы комплемента С3 и С4 в крови детей с ГУС выделено две группы: в острой фазе ГУС – 35 пациентов с медианой возраста 2,33 (1,0–9,42) года и 124 ребенка, перенесших ГУС в анамнезе, в возрасте 6,21 (1,58–16,08) года, катамнез заболевания 4,34 (0,5–9,17) года. Фракции комплемента С3, С4 исследовали на автоматическом биохимическом анализаторе Olympus MU 400 (Beckman Coulter, США) методом турбодиметрии с использованием наборов BioSystems (Испания).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью программы Microsoft Excel и Statistica 10.0. Рассчитывали средние величины и стандартное отклонение ($M \pm SD$) при нормальном распределении признака, медиану и квартили: $Me (P25; P75)$ и $Me (min-max)$ – при неправильном. Для сравнения переменных с нормальным распределением использовали параметрические методы статистической обработки, при неправильном – непараметрические: хи-квадрат (χ^2), χ^2 с поправкой Йейтса (χ^2 Йейтса), тест Манна–Уитни. Взаимосвязь переменных оценивали по коэффициенту корреляции Спирмена (r_s). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. У всех детей в острой фазе ГУС при поступлении в ДЦ, с потребностью в заместительной почечной терапии (ЗПТ) и без, выявлено значимое повышение NGAL в сравнении с таковым у детей после перенесенного ГУС (3-я группа) и в контроле (4-я группа) (табл. 1, рис. 1). В процессе восстановления функции почек отмечалось незначительное снижение NGAL в группе ГУС без диализа в сравнении с таковым во 2-й группе, что можно объяснить более быстрой нормализацией уровней креатинина крови (в 1-й группе – за $7,2 \pm 4,4$ дня, а во 2-й – за $18,2 \pm 6,7$ дня, $p < 0,001$), при том что на восстановление эпителия проксимальных почечных канальцев, как правило, требуется больше времени. Степень повышения уровней NGAL была существенно выше в группе детей, нуждавшихся в диализе (табл. 1, рис. 1).

У ребенка с фатальным исходом аГУС в динамике отмечалось повышение уровня NGAL, а у пациентки с исходом в терминальную ХПН уровень NGAL в процессе течения патологического процесса в почках практически не изменился (табл. 1).

Маркером раннего повреждения почек является NGAL, уровень которого существенно повышается в сыворотке крови и в моче через часы после развития ОПП [9]. Н. Trachtman и соавт. [11] впервые изучено изменение концентрации NGAL в моче у детей с ГУС Д «+» в зависимости от тяжести почечного повреждения. Авторы отдают предпочтение измерению данного маркера в моче, так как в сыворотке крови его уровень может повышаться при васкулитах [12] и без почечного повреждения. Поскольку ГУС Д «+» не относится к васкулитам,

Таблица 1. Динамика изменений NGAL в сыворотке крови у пациентов с ГУС Д «+»

Пациенты	NGAL в сыворотке крови, нг/мл			
	1-я точка	2-я точка	3-я точка	4-я точка
1-я группа (n = 6)	123,5 [85,8; 281,1]	139,5 [82,7; 173,0]	–	103,7 [90,1; 106,3]
2-я группа (n = 21)	415,2 [345,2; 508,0]*	356,1 [332,9; 427,3]**	245,3 [216,2; 303,5]*, **, ***	78,2 [66,2; 145,0]*, **, ***
3-я группа (сравнения) (n = 60)	42,9 [30,1; 55,4]			
4-я группа (контроль) (n = 28)	53,8 [43,5; 63,1]			
<i>p</i>	<i>p</i> 1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 < 0,001	<i>p</i> 1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 < 0,001	<i>p</i> 2-3, 2-4 < 0,001	<i>p</i> 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 < 0,05
№ 1 (аГУС)	365,2	469,6	–	–
№ 2 (аГУС)	393,5	364,5	388,5	–

Примечание. *, **, *** – $p < 0,01$.

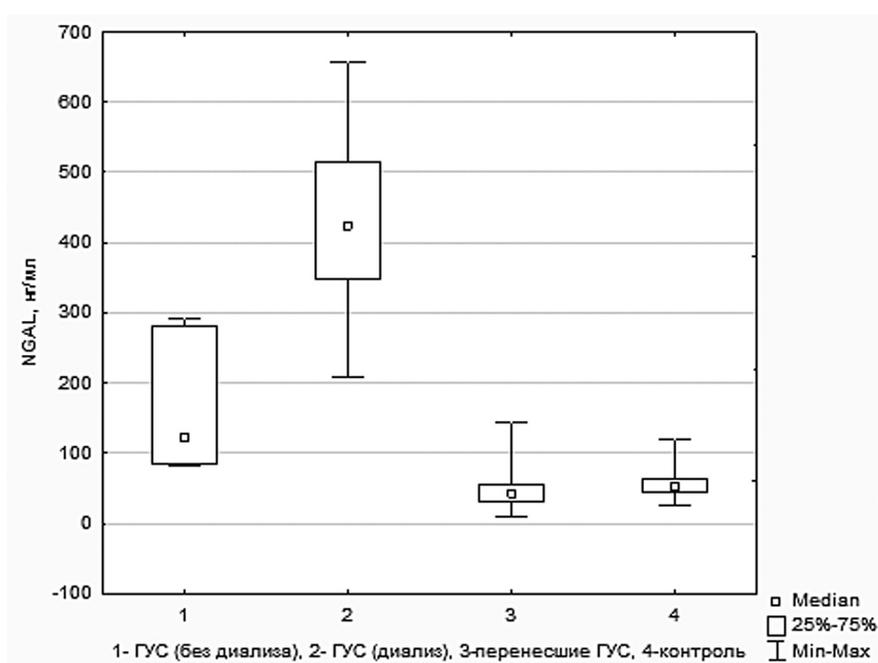


Рис. 1. Уровни NGAL сыворотки крови детей с ГУС Д «+» при поступлении в диализный центр

а у большинства пациентов рано развивается анурия, нами предпринята попытка оценить уровень NGAL и динамику его изменения в крови при данной патологии. Выявленное при поступлении в ДЦ повышение NGAL у всех детей (как нуждавшихся, так и не нуждавшихся в ЗПТ), свидетельствует о развитии ренальных повреждений. Более значимое повышение NGAL у пациентов с ГУС, которые в последующем получали ЗПТ ($p < 0,001$), отражает тяжесть повреждения проксимальных почечных канальцев и определяет дальнейший прогноз (табл. 1, рис. 1). Оценка концентрации NGAL в сыворотке крови и динамики его изменения может служить основой для выработки критериев почечного повреждения при ГУС и выбора тактики лечения (необходимости начала диализной терапии).

На активацию системы комплемента по альтернативному пути указывает существенное снижение фракции С3 ($p < 0,001$) у 76,5 % детей в острой фазе ГУС Д «+» при госпитализации в ДЦ и сохранение в пределах нормы концентрации С4. В динамике заболевания отмечалось увеличение как С3 ($p < 0,001$), так и С4 фракций ($p < 0,001$) (табл. 2).

Таблица 2. Белки системы комплемента С3 и С4 у детей с ГУС Д «+»

Уровни фракций С3, С4 при поступлении/выписке из ДЦ	ГУС, острая фаза	ГУС, перенесенный	<i>p</i>
С3 (норма 0,9–1,8 г/л): при поступлении, г/л частота низких уровней (%) при выписке, г/л частота низких уровней (%)	0,75 [0,67; 0,91]* 26/34 (76,5)** 1,18 [1,06; 1,28]* 2/31 (6,5)**	1,06 [0,95; 1,18] 22/124 (17,7) 1,06 [0,95; 1,18] 22/124 (17,7)	$U = 791, p < 0,001$ $\chi^2 = 43,51, p < 0,001$ $U = 1152, p < 0,01$ –
<i>p</i>	$U = 112, p^* < 0,001$ $\chi^2_{\text{Йейтса}} = 29,63, p^{**} < 0,001$		
С4 (норма 0,1–0,4 г/л): при поступлении, г/л частота низких уровней (%) частота повышенных значений (%) при выписке, г/л частота повышенных значений (%)	0,21 [0,19; 0,25]*** 0/35 (0) 0/35 (0)**** 0,34 [0,28; 0,39]*** 5/29 (17,2)****	0,26 [0,23; 0,3] 2/124 (1,6) 2/124 (1,6) 0,26 [0,23; 0,3] 2/124 (1,6)	$U = 1230, p < 0,001$ – – $U = 833, p < 0,001$ $\chi^2_{\text{Йейтса}} = 9,81, p < 0,01$
<i>p</i>	$U = 107,5, p^{***} < 0,001$ $\chi^2_{\text{Йейтса}} = 3,06, p^{****} = 0,08$		

Примечание. *, **, ***, **** – значения, между которыми рассчитывалась значимость различий.

По-видимому, активация альтернативного пути комплемента связана с тяжестью повреждения почек, о чем свидетельствует снижение С3 фракции комплемента ниже возрастной нормы у 85,7 % пациентов с ГУС, нуждавшихся в диализе, по сравнению с теми, кому он не был показан (28,6 % детей, $p < 0,01$), и теми, кто перенес ГУС ранее (17,7 %, $p < 0,01$). Такая же закономерность выявлена и при сравнении абсолютных значений С3 (0,73 (0,62; 0,84) г/л по сравнению с 1,07 (0,89; 1,29) и 1,06 (0,95; 1,18) г/л соответственно, $p < 0,001$) (рис. 2).

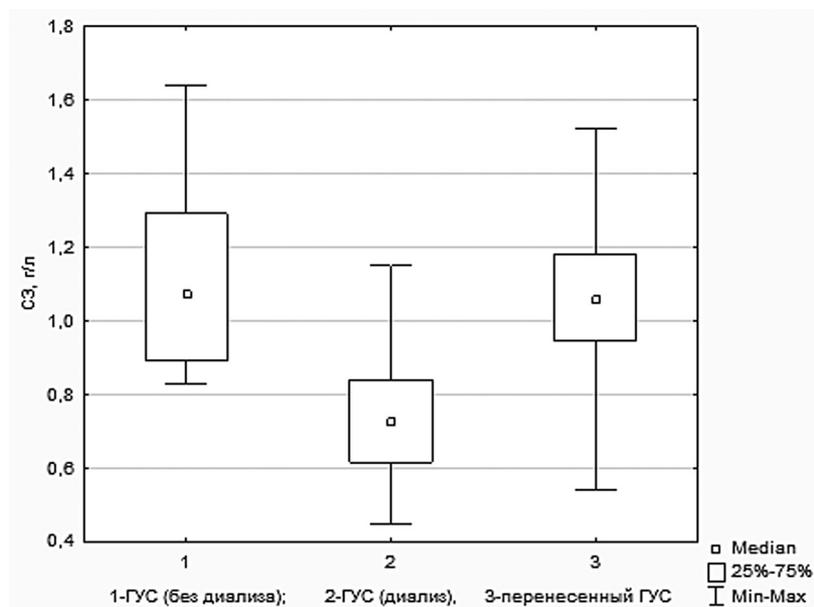


Рис. 2. Уровни С3 фракции комплемента у детей с ГУС Д «+» при поступлении в диализный центр

Выраженное снижение С3 фракции комплемента выявлено у детей с аГУС: у № 1 – 0,56 г/л, у № 2 – 0,69 г/л, при нормальных уровнях С4 – 0,18 и 0,35 г/л соответственно.

Снижение концентрации С3 фракции комплемента и продуктов его распада (С3b, С3с, С3d) у детей с ГУС Д «+» ранее описано в литературе [13, 14]. Повышение уровня продуктов распада

Таблица 3. Взаимосвязи уровней NGAL, С3 фракции комплемента с различными параметрами, включая определяющие степень почечного повреждения, у детей с ГУС Д «+»

Параметр	NGAL (r_s)	С3 комплемент (r_s)
Потребность в диализе	0,73	-0,6
Длительность госпитализации в реанимации	0,56	-0,49
Длительность госпитализации в ДЦ	0,68	-0,53
Длительность нормализации тромбоцитов крови	0,46	-0,44
Длительность нормализации креатинина	0,51	-0,59
Продолжительность анурии	0,72	-0,48
Продолжительность диализа	0,7	-0,54
<i>При поступлении в диализный центр</i>		
Натрий	-0,71	-
Общий белок	-0,64	0,52
Альбумин	-0,49	-
Креатинин	0,79	-0,45
Лактатдегидрогеназа	0,55	-
Аланинаминотрансфераза	0,84	-0,42
Общий билирубин	-0,67	-
IgG	-	0,67
С4 фракция комплемента	-	0,64

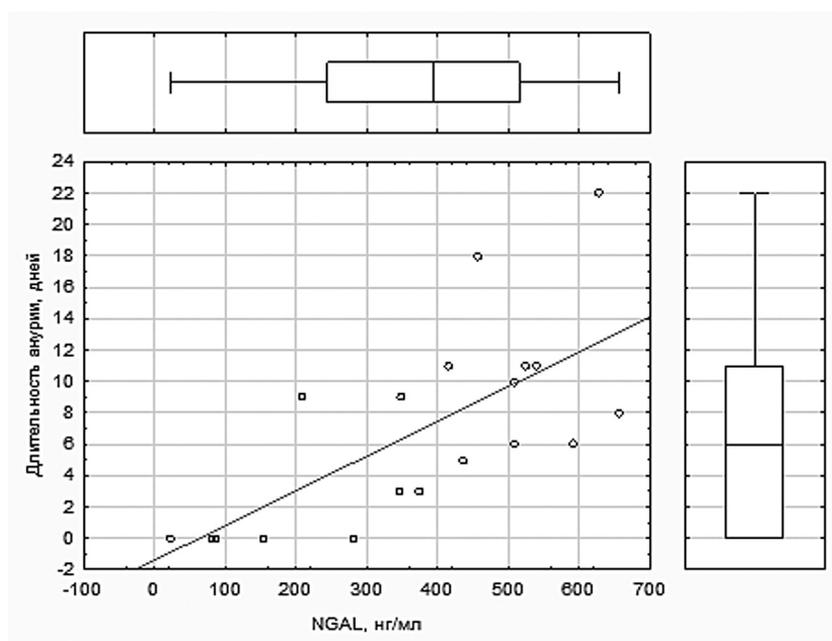


Рис. 3. Корреляционная зависимость длительности анурии от уровня NGAL в крови пациентов при поступлении в диализный центр

да С3 и фактора В указывало на активацию альтернативного пути комплемента [13]. В последующем это подтверждено высокими уровнями фактора Вв и мембраноатакующего комплекса комплемента C5b-9 у детей в острой фазе ГУС Д «+» [15–17]. Однако не обнаружено взаимосвязи между степенью активации комплемента и тяжестью почечных повреждений и исходов ГУС [15, 16]. По результатам нашего исследования снижение С3 фракции комплемента при нормальном уровне С4 в крови свидетельствовало об активации комплемента по альтернативному пути у всех пациентов с ГУС Д «+». Кроме того, установлена связь между активацией системы комплемента и тяжестью почечного повреждения: уровни С3 были ниже и встречались чаще у детей, нуждавшихся в ЗПТ ($p < 0,001$) (рис. 2).

Нами выявлены корреляционные связи между уровнями NGAL, С3 фракции комплемента сыворотки крови при поступлении в ДЦ у детей с ГУС Д «+» и показателями, отражающими степень тяжести почечного повреждения и исхода (табл. 3, рис. 3).

Уровни NGAL и С3 фракции комплемента в сыворотке крови пациентов с ГУС Д «+» отражают тяжесть почечного повреждения, что подтверждается выявлением тесных корреляционных связей между их значениями и факторами, определяющими это повреждение (уровнями креатинина при поступлении в ДЦ ($r_s = 0,79$ и $r_s = -0,45$), длительностью их нормализации ($r_s = 0,51$ и $r_s = -0,59$), наличием потребности в диализе ($r_s = 0,73$ и $r_s = -0,6$), продолжительностью анурии ($r_s = 0,72$ и $r_s = -0,48$) и диализа ($r_s = 0,7$ и $r_s = -0,54$ соответственно)).

Среднесрочный прогноз при аГУС неблагоприятный (причем у взрослых чаще, чем у детей) и определяется генотипом аномалии системы комплемента [3, 18].

Заключение. Результаты настоящего исследования показали, что определение уровня NGAL в сыворотке крови пациентов с ГУС позволяет выявлять острое почечное повреждение на ранних стадиях заболевания. Получены убедительные данные, указывающие на активацию альтернативного пути системы комплемента у детей с ГУС Д «+», а также на то, что степень снижения фракции комплемента С3 и повышения концентрации липокалина-2 крови отражают тяжесть почечного повреждения.

Список использованной литературы

1. *Ruggenti, P.* Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura / P. Ruggenti, M. Noris, G. Remuzzi // *Kidney Int.* – 2001. – Vol. 60, N 3. – P. 831–846.
2. *Байко, С. В.* Гемолитико-уремический синдром: эпидемиология, классификация, клиника, диагностика, лечение (часть 1) / С. В. Байко // *Нефрология и диализ.* – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 370–377.
3. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children / C. Loirat [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2016. – Vol. 31, N 1. – P. 15–39.
4. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury // *Kidney Int. Suppl.* – 2012. – Vol. 2, N 1. – P. 1–138.
5. *Uchino, S.* Serum creatinine / S. Uchino // *Curr. Opin. Crit. Care.* – 2010. – Vol. 16, N 6. – P. 562–567.
6. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase / L. Kjeldsen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, N 14. – P. 10425–10432.
7. *Kjeldsen, L.* Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse / L. Kjeldsen, J. B. Cowland, N. Borregard // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1482, N 1–2. – P. 272–283.
8. The predictive performance of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) increases with grade of acute kidney injury / A. Haase-Fielitz [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2009. – Vol. 24, N 11. – P. 3349–3354.
9. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early biomarker for ischemic renal injury / J. Mishra [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – Vol. 14, N 10. – P. 2534–2543.
10. *Cho, H.* Complement regulation: physiology and disease relevance / H. Cho // *Korean J. Pediatr.* – 2015. – Vol. 58, N 7. – P. 239–244.
11. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in D+HUS: a novel marker of renal injury / H. Trachtman [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2006. – Vol. 21, N 7. – P. 989–994.
12. *Ohlsson, S.* Increased circulating levels of proteinase 3 in patients with anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibodies-associated systemic vasculitis in remission / S. Ohlsson, J. Wieslander, M. Segelmark // *Clin. Exp. Immunol.* – 2003. – Vol. 131, N 3. – P. 528–535.
13. The complement system in hemolytic-uremic syndrome in childhood / L. Monnens [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1980. – Vol. 13, N 4. – P. 168–171.
14. Hypocomplementemia and leukocytosis in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome / W. L. Robson [et al.] // *Nephron.* – 1992. – Vol. 62, N 3. – P. 296–299.
15. *Keir, L. S.* Current evidence for the role of complement in the pathogenesis of Shiga toxin haemolytic uraemic syndrome / L. S. Keir, M. A. Saleem // *Pediatr. Nephrol.* – 2014. – Vol. 29, N 10. – P. 1895–1902.
16. Alternative pathway of complement in children with diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome / J. M. Thurman [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2009. – Vol. 4, N 12. – P. 1920–1924.
17. Diagnosis of complement alternative pathway disorders / A. Angioi [et al.] // *Kidney Int.* – 2016. – Vol. 89, N 2. – P. 278–288.
18. *Лора, Ш.* Атипичный гемолитико-уремический синдром / Ш. Лора, В. Фремю-Бачи // *Нефрология.* – 2012. – Т. 16, № 2. – С. 16–48.

Поступила в редакцию 27.06.2016

УДК 616.832:616.711.6-001]-07

И. А. ИЛЬЯСЕВИЧ, Е. В. СОШНИКОВА, А. Н. МАЗУРЕНКО, О. Н. ВАСЬКО, К. А. КРИВОРОТ

ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ В ДИАГНОСТИКЕ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИЙ СПИННОГО МОЗГА

*Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, Минск, Беларусь,
e-mail: inessa.ilyasevich@mail.ru*

Выполнена электрофизиологическая оценка функционального состояния спинного мозга у 30 пациентов с оскольчатыми переломами L_1 -позвонка до и после операции. Данные, полученные при анализе результатов суммарной и стимуляционной электромиографии, транскраниальной магнитной стимуляции и соматосенсорных вызванных потенциалов, позволили количественно оценить степень нарушения функций спинного мозга и его корешков при травматическом повреждении поясничного отдела позвоночника.

Ключевые слова: повреждение поясничного отдела позвоночника, спинной мозг, суммарная и стимуляционная электромиография, транскраниальная магнитная стимуляция, соматосенсорные вызванные потенциалы.

I. A. ILYASEVICH, E. V. SOSHNIKOVA, A. N. MAZURENKO, O. N. VASKO, R. A. KRIVOROT

EVALUATION OF THE DESCRIPTIVENESS OF ELECTROPHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN THE DIAGNOSIS OF SPINAL CORD DISORDERS

Republic Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics, Minsk, Belarus, e-mail: inessa.ilyasevich@mail.ru

The electrophysiological evaluation of the features of the functional state of the spinal cord in 30 patients with fractured L1 vertebra before and after operation was performed. The analysis data of the results of total and stimulating electromyography, transcranial magnetic stimulation and somatosensory evoked potentials allowed one to estimate the degree of the disorder of the spinal cord and its roots in lumbar spine damage.

Keywords: lumbar spine damage, spine cord, total and stimulating electromyography, transcranial magnetic stimulation, somatosensory evoked potentials.

Введение. Травма позвоночника и спинного мозга (СМ) сопровождается сложным комплексом двигательных, чувствительных и вегетативных нарушений, из которых наиболее тяжелым в прогностическом отношении является расстройство движений [1, 2]. Эффективное решение проблемы восстановления контроля двигательной функции ниже уровня травмы СМ остается актуальным вопросом. Современные достижения медицинских и биологических наук в этом направлении свидетельствуют о сложных нейрофизиологических и биохимических процессах деструкции и одновременно регенерации, развивающихся в нервных структурах СМ после травмы позвоночника. Сегодня практическая медицина делает только первые шаги на пути использования этих знаний для эффективной регуляции процессов регенерации СМ [3]. Одним из основных способов реабилитации пациентов с этой травматической болезнью является освоение пострадавшими компенсаторных физических навыков взамен утраченных функций на основе сохраненных морфофункциональных структур СМ. Для проведения эффективного реабилитационного комплекса целесообразно знать состояние функций СМ в до- и послеоперационном периодах.

Среди большого количества публикаций, посвященных аспектам изменения соматического и психического состояния пациентов с травматической болезнью СМ, попытки комплексного нейрофизиологического анализа закономерностей патогенеза двигательных нарушений ниже уровня травмы обобщены в единичных тематических статьях [3, 4–6]. Недостаточно изучена и эффективность нейрофизиологической диагностики.

Цель работы – определение информативности критериев электрофизиологического исследования функционального состояния структур спинного мозга в динамике оперативного лечения пациентов с травматическим повреждением поясничного отдела позвоночника.

Материалы и методы исследования. Выполнен анализ нейрофизиологических данных, зарегистрированных у 30 пациентов (возраст от 18 до 56 лет) с оскольчатым переломом первого поясничного позвонка (L_1). Для оскольчатых повреждений характерно не только нарушение целостности среднего позвоночного столба по F. Denis [7], но и переднего полукольца позвоночного канала с передней компрессией СМ. По данным клинико-неврологического обследования, неосложненное повреждение позвоночника диагностировано у 15 пациентов (I группа), осложненное повреждение (II группа) – у 15.

Разделение оскольчатых переломов позвоночника на осложненные и неосложненные по степени выраженности неврологического дефицита является условным, так как неблагоприятные исходы лечения пациентов с неосложненным переломом позвоночника обусловлены несвоевременно диагностированным травматическим стенозом и неустраненным сдавлением нервно-сосудистых образований позвоночного канала [8]. Неполное обследование пострадавших с неосложненными повреждениями в остром и раннем периодах после травмы позвоночника, недооценка незначительных неврологических расстройств может приводить к ошибкам в диагностике и тактике лечения, а в итоге – к неудовлетворительным результатам.

При оценке степени функциональных расстройств нижних конечностей руководствовались шкалой международного стандарта неврологических нарушений при травме позвоночника и спинного мозга ASIA (ASIA/ISCSIC – American Spine Injury Association / International Standards for Neurological and functional Classification of Spinal Cord Injury) [2]. В зависимости от клинических проявлений патологии результаты диагностики рассматривали в двух подгруппах пациентов с осложненной травмой позвоночника: с нарушением функции по типу C ($n = 8$) и с нарушением функции по типу B ($n = 7$). Согласно классификации ASIA, степень неврологических нарушений по типу B характеризуется сохранением чувствительности ниже уровня поражения, но не движения. Тип неврологического нарушения C характеризуется сохранением двигательной функции, при этом мышечная сила ключевых мышц ниже уровня повреждения составляет менее 3 баллов.

Сроки обследования: до операции (первые 1–4 дня после травмы), острый период (3 недели), ранний период (1–3 мес. с момента травмы). Контрольную группу составили 15 здоровых лиц (средний возраст 36,2 года). Для декомпрессии невралгических структур СМ при оскольчатом переломе позвоночника использовали способы внутренней фиксации, которые позволяют сократить сроки наступления костного сращения, улучшить результаты оперативного вмешательства и начать комплекс реабилитационно-восстановительного лечения в максимально ранние сроки. Основные направления использования имплантатов в поясничном отделе позвоночника – это винтовая транспедикулярная фиксация и замещение тел позвонков костными (ауто-, аллогенными) и искусственными (титановыми, полимерными) имплантатами.

Методом суммарной электромиографии (ЭМГ) регистрировали биоэлектрическую активность мышц нижних конечностей при их произвольном напряжении. С помощью стимуляционной ЭМГ осуществляли регистрацию и анализ параметров вызванных ответов: центральной F-волны мышц стоп (L_5-S_1), рефлекторного Н-потенциала и периферического М-ответа мышц голени и стопы (*mm. extensor digitorum brevis, abductor hallucis, m. soleus*) при электрическом раздражении нервов (*nn. peroneus et tibialis*). Определяли амплитуду и латентное время вызванных ответов. Рассчитывали скорость проведения импульса по периферическим нервам конечностей и определяли показатель рефлекторной возбудимости мышц как отношение амплитуды максимального мышечного (М) и рефлекторного (Н) потенциалов (Н/М).

Состояние нисходящих моторных путей СМ и двигательных корешков оценивали по данным транскраниальной и корешковой магнитной стимуляции (ТМС и КМС соответственно). Магнитный индуктор располагали в проекции моторной зоны коры головного мозга, являющейся корковым представителем мышц нижних конечностей. Для стимуляции спинномозгового нерва магнитную катушку ориентировали над остистым отростком соответствующего позвонка в поясничной области. Моторные ответы (МО) мышц бедра (*mm. rectus femoris, vastus lateralis* –

L_2-L_4), мышц голени (*m. tibialis anterior*) и стопы (*m. extensor digitorum brevis* – L_5 , *m. abductor hallucis* – S_1) регистрировали при последовательной транскраниальной и корешковой (в поясничной области) магнитной стимуляции. По разности латентного времени МО, зарегистрированных в одной и той же мышце стопы при КМС и ТМС, рассчитывали время центрального моторного проведения (ВЦМП) по нисходящим трактам СМ.

Для оценки проводимости восходящих путей СМ осуществляли регистрацию соматосенсорных вызванных потенциалов (ССВП) в ответ на электрическое раздражение большеберцового нерва в области медиальной лодыжки. Регистрировали периферический ответ нерва в подколенной ямке (Pf), спинальный пик N22 (ответ нейронов конуса СМ) и позитивно-негативный корковый комплекс $P_{38}-N_{45}$.

Оборудование: цифровая электрофизиологическая установка Nicolet Viking Select (Nicolet Biomedical, США) в комплексе с магнитным стимулятором Magstim-200 (Magstim Company Ltd, Великобритания).

Результаты и их обсуждение. При клиническом осмотре в первые сутки после травмы пациенты I группы предъявляли жалобы на боль в поясничном отделе позвоночника. При этом такие неврологические расстройства, как снижение чувствительности, ограничение движений нижних конечностей, нарушение функции тазовых органов, не выявлены.

При произвольном напряжении мышц бедер, голени и стоп у пациентов I группы регистрировали биоэлектрическую активность, амплитуда и частота которой были уменьшены на 25–30 % по сравнению с контролем. На фоне общего снижения ЭМГ у всех пациентов наблюдали умеренное асимметричное изменение ее параметров по корешковому типу с характерным снижением функции в определенной зоне двигательной иннервации на одной из конечностей (в дальнейшем – доминирующая и угнетенная стороны). Перестройка структуры ЭМГ по типу переднероговой (тип II ЭМГ) не обнаружена. Изучение рефлекторной и моторной возбудимости мышц (L_5-S_1) по данным вызванных ответов (Н-рефлекса, М-ответа, F-волны) выявило общее и асимметричное снижение амплитуды этих показателей по сравнению с контролем. При этом динамика центральной F-волны на усиление интенсивности раздражения оставалась стабильной. Амплитуда Н-рефлекса уменьшилась с $5,6 \pm 1,3$ до $2,6 \pm 0,8$ мВ на угнетенной стороне (в контроле – $6,2 \pm 1,2$ мВ), а амплитуда М-ответа снизилась до $7,6 \pm 1,8$ мВ (в контроле – $10,2 \pm 2,2$ мВ). Характер билатеральной асимметрии амплитуды Н- и М-ответов совпадал с данными суммарной ЭМГ и свидетельствовал о преимущественном снижении возбудимости мышц на стороне болевого синдрома.

Применение бесконтактной магнитной стимуляции позволило оценить моторную возбудимость и проводимость нервных структур поясничных сегментов СМ и его корешков. Изменения амплитуды МО мышц бедра, голени и стоп отражали асимметричные колебания ее величины (до 30 %). Латентное время МО мышц стоп было умеренно удлинено до $40,0 \pm 2,2$ мс (в контроле – $38,4 \pm 1,6$ мс). Критерии оценки функции СМ свидетельствовали об отсутствии нарушений моторной проводимости СМ и его корешков на уровне травмы позвоночника.

Через 2 недели после операции проводили повторное обследование – контроль функции СМ, его корешков и мышц для оценки динамики репаративного процесса для целенаправленной коррекции восстановительного лечения. Как показал анализ электрофизиологических показателей, для раннего восстановительного периода характерно сохранение сниженного фона количественных параметров ЭМГ в сочетании с восстановлением билатерального режима функционирования симметричных мышц за счет преимущественного роста параметров ЭМГ на угнетенной стороне. Полученные результаты подтверждались данными ТМС, которые отражали процессы нормализации корешковой проводимости (рис. 1).

На рис. 1 видно, что через неделю после операции декомпрессии и стабилизации позвоночника у пациента Ш. наблюдается полное восстановление моторной проводимости СМ и его корешков на уровне перелома: латентное время МО нормализовалось до 35,0 мс (до операции этот показатель был увеличен до 41,0 мс).

Исключением в данной группе являлась динамика ЭМГ, зарегистрированная у двух пациентов с неосложненным оскольчатый переломом позвоночника, у которых до операции выявлены

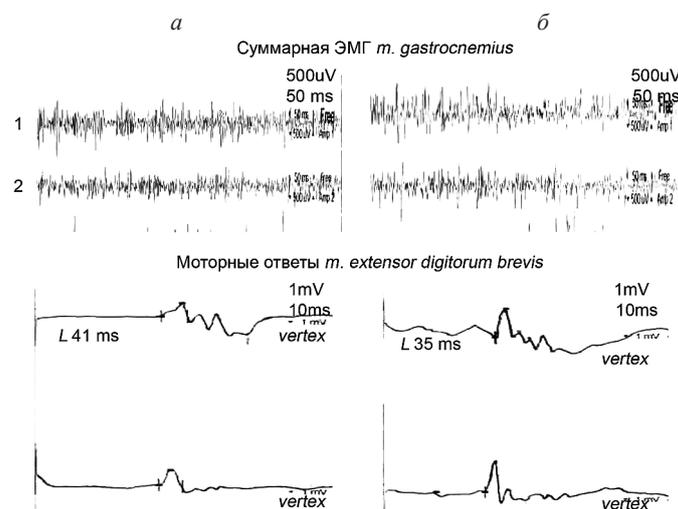


Рис. 1. Динамика электрофизиологических показателей у пациента Ш. с оскольчатый неосложненным переломом L_1 -позвонка до (а) и через 7 дней после (б) операции: 1 – суммарная ЭМГ справа, 2 – суммарная ЭМГ слева, L – латентное время моторного ответа

признаки выраженной моторной недостаточности поясничных сегментов СМ (L_5) и его корешков. Полученные результаты включали комплекс электрофизиологических нарушений, которые характеризовались значительной асимметрией ЭМГ мышц голени и стоп, угнетением Н-рефлексов на обеих сторонах, удлинением времени центрального и корешкового моторного проведения импульса на 30–50 %. Выявленные нарушения свидетельствовали о субклинических признаках травматического повреждения СМ и его корешков на уровне перелома позвоночника.

На рис. 2 представлены данные суммарной ЭМГ пациента К., свидетельствующие о патологической перестройке двигательных единиц мышц голени обеих конечностей в сочетании со значительным удлинением времени моторного проведения импульса на участке пояснично-крестцовых сегментов СМ и его корешков до 47,0 мс (по данным ТМС).

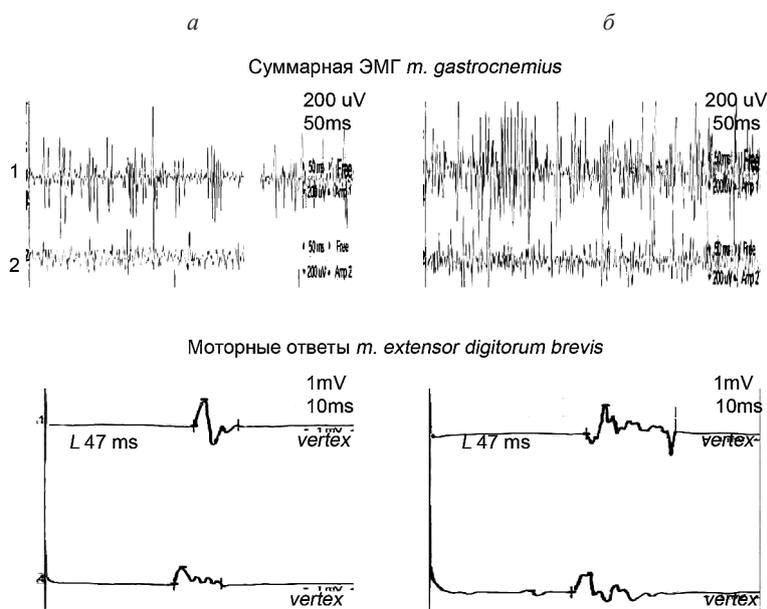


Рис. 2. Динамика электрофизиологических показателей у пациента К. с оскольчатый переломом L_1 -позвонка до (а) и через 7 дней после (б) операции. Обозначения те же, что и на рис. 1

При обследовании пациентов с осложненной травмой позвоночника установлено, что попытка произвольного напряжения мышц нижних конечностей сопровождается низкоамплитудной биоэлектрической активностью с нарушением структуры по редуцированному типу. У пациентов с нижним парапарезом (группа С) биоэлектрическая активность мышц бедер (*m. quadriceps*) имела признаки умеренного или незначительного количественного и качественного нарушения структуры ЭМГ.

Анализ электрофизиологических параметров мышц голени и стоп в подгруппах В и С показал более выраженные нарушения, которые сопровождалась угнетением амплитуды ЭМГ мышц вплоть до биоэлектрического молчания (подгруппа В) на одной или обеих конечностях (табл. 1). Структура ЭМГ характеризовалась грубыми нарушениями по типу патологической перестройки в передних рогах СМ.

Показатели рефлекторной и моторной возбудимости мышц голени и стоп (Н-рефлекс, М-ответ, F-волна) были снижены до пороговой величины у пациентов из подгруппы С (табл. 2) и не определялись в подгруппе В, что указывало на нарушение рефлекторной возбудимости двигательных ядер поясничных сегментов СМ.

Т а б л и ц а 1. Средние значения амплитуды (мкВ) суммарной ЭМГ мышц нижних конечностей при травме поясничного отдела позвоночника (M ± m)

Название мышцы	I группа		II группа, тип С		II группа, тип В		Контроль
	Д	У	Д	У	Д	У	
<i>m. vastus lateralis</i>	500 ± 78	420 ± 85	406 ± 165	374 ± 62	280 ± 45*	120 ± 43*	902 ± 240
<i>m. tibialis anterior</i>	540 ± 148	446 ± 181	175 ± 33*	50 ± 30*	100 ± 33*	50 ± 20*	968 ± 278
<i>m. extensor hallucis longus</i>	430 ± 126	340 ± 92*	100 ± 24*	60 ± 33*	–	–	607 ± 106
<i>m. gastrocnemius</i>	242 ± 110	160 ± 48*	80 ± 35*	50 ± 27*	–	–	566 ± 137

П р и м е ч а н и е. I группа – пациенты с неосложненной травмой позвоночника; II группа – пациенты с осложненной травмой позвоночника по типу В и С. Д – доминирующая сторона, У – угнетенная сторона; * – достоверные изменения параметра по *t*-критерию Стьюдента при $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Т а б л и ц а 2. Средние значения амплитуды Н-рефлекса и М-ответа мышц голени (L_5-S_1) при травме поясничного отдела позвоночника (M ± m)

Амплитуда ответа <i>m. soleus</i> , мВ	I группа		II группа, тип С		Контроль
	Д	У	Д	У	
Н-рефлекс	5,6 ± 1,6	2,6 ± 0,5*	1,0 ± 0,3*	0,3 ± 0,05*	6,7 ± 0,6
М-ответ	9,9 ± 1,4	5,8 ± 1,1*	3,6 ± 0,8*	2,4 ± 0,6*	12,4 ± 1,1

П р и м е ч а н и е. Обозначения те же, что в табл. 1.

По данным ТМС, частичному нарушению проводимости СМ соответствовал электрофизиологический паттерн, характеризующийся уменьшением амплитуды МО в сочетании с удлинением его латентности и показателя ВЦМП (табл. 3). При полном функциональном блоке СМ МО мышц с двигательной иннервацией ниже области травмы отсутствовали (подгруппа В).

Т а б л и ц а 3. Средние значения амплитуды и латентного времени МО мышц стоп при травме поясничного отдела позвоночника (M ± m)

Параметр МО <i>m. extensor digitorum brevis</i>	I группа		II группа, тип С		Контроль
	Д	У	Д	У	
Амплитуда, мВ	2,2 ± 0,6	1,5 ± 0,4	0,2 ± 0,01*	0,1 ± 0,01*	2,6 ± 0,5
Латентность, мс	37,0 ± 1,5	39,0 ± 2,0	42,0 ± 2,5*	45,0 ± 3,3*	38,0 ± 2,0

П р и м е ч а н и е. Обозначения те же, что в табл. 1.

Для изучения изменений проводимости восходящих путей СМ осуществляли регистрацию ССВП при электрическом раздражении большеберцового нерва. При частичном нарушении функции афферентных проводников СМ спинальные и корковые ССВП-пики регистрировались,

при клинически полном нарушении проводимости они отсутствовали. Следует отметить, что у 5 пациентов из 7 с нижним парапарезом и пlegией стоп МО и ССВП ниже уровня перелома не определялись. Однако у двух пациентов, несмотря на отсутствие двигательной функции мышц дистальных сегментов конечностей, а также электрофизиологических признаков ее активности (ЭМГ, Н-рефлекс, МО при ТМС), регистрировали ССВП-пики пороговой величины. Параметры этих потенциалов подтверждали сохранность проводимости слабо миелинизированных сенсорных путей, локализованных в дорсальных отделах СМ, на фоне блока моторной проводимости нервных структур его передних отделов. Эти данные указывали на имеющиеся индивидуальные различия в сохранности нервных тактов СМ после травмы позвоночника, которые необходимо учитывать при проведении реабилитационных мероприятий.

Динамика электрофизиологических параметров в сроки 1–3 мес. после травмы у пациентов с нижним парапарезом (подгруппа С) показала, что при попытке произвольного напряжения мышц наблюдается выраженное увеличение амплитуды суммарной ЭМГ мышц бедер по сравнению с исходными данными и незначительное увеличение амплитуды биоэлектрической активности мышц голени и стоп. Восстановление осцилляций суммарной ЭМГ с амплитудой до 30–50 мкВ (в мышцах, где исходно регистрировали биоэлектрическое молчание) указывало на сохранность сегментарных нервных связей с единичными двигательными единицами скелетной мышцы, количество которых не обеспечивало восстановление полезной двигательной активности мышц ниже уровня повреждения. В то же время даже минимальная сохранность нервных связей на уровне травмы сопровождалась более быстрым заживлением пролежней, появлением в нижних конечностях компенсаторных двигательных навыков за счет адаптации сухожильно-мышечного аппарата, имеющего пограничную иннервацию с надочаговыми сегментарными структурами.

Детальный анализ электрофизиологических параметров показал, что данные стимуляционной ЭМГ, зарегистрированные в остром и раннем периодах в I и II группах, отражают развитие в СМ процессов спинального шока (рис. 3). Они характеризовались значительным уменьшением или угнетением амплитуды Н-рефлекса и М-ответа. Поэтому диагностическая ценность этих данных в остром и раннем периодах после травмы снижена. Восстановление Н- и М-ответов отмечали не ранее чем через 2–3 мес.

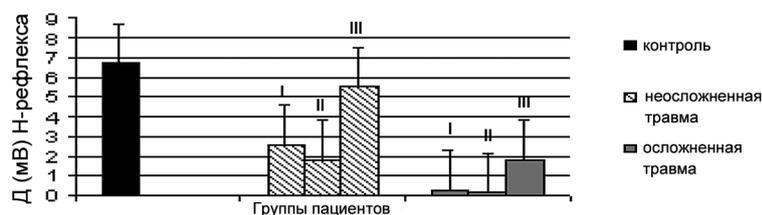


Рис. 3. Динамика амплитуды Н-рефлекса до операции (I) и в ранние сроки (II – через 1–2 недели после операции; III – через 1–3 мес. после травмы поясничного отдела позвоночника и спинного мозга)

Следует отметить закономерности, касающиеся особенностей восстановления рефлекторного (Н) и центрального (F) ответов мышц голени и стоп, в механизме генерации которых принимает участие один и тот же сегментарный уровень замыкания разряда (L_5-S_1). Сохранение F-волны в остром периоде свидетельствовало о наличии интактных мотонейронов передних рогов на уровне поражения СМ. Известно, что механизм генерации Н-рефлекса зависит не только от морфологической сохранности сегментов СМ, но и от баланса возбуждающих и тормозных влияний, поступающих к спинальным центрам по нисходящим пирамидным путям [9]. Поэтому дефицит (или блок) пирамидной импульсации при повреждении СМ сопровождался подавлением Н-рефлекса мышц нижних конечностей, что соответствовало физиологическим признакам спинального шока, длительность которого, по разным источникам, составляет от 2 до 6 мес. и более.

Применение ТМС у пациентов с осложненной травмой поясничного отдела позвоночника показало, что, в отличие от Н-рефлекса, параметры вызванных МО в остром и раннем периодах

отличались стабильным и закономерным изменением электрофизиологического паттерна. Они характеризовались закономерным увеличением амплитуды и нормализацией латентного времени МО, что отражало восстановление моторной проводимости СМ в самые ранние сроки. Так, через 1–2 недели после оперативного лечения, когда, по данным ЭМГ, еще определялось общее снижение функционального состояния нервно-мышечного аппарата ниже уровня повреждения, параметры МО уже отражали нормализацию проводниковой функции моторных трактов МС. Поэтому сохранность МО в ранние сроки после травмы позвоночника имела важное диагностическое значение для определения степени нарушения нервных структур и функционального прогноза (рис. 4).

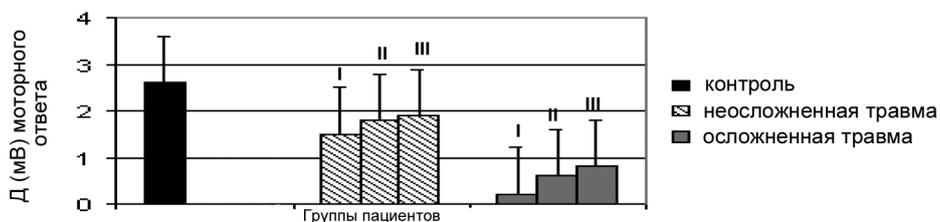


Рис. 4. Динамика амплитуды моторного ответа (МО) мышц стоп при транскраниальной магнитной стимуляции до операции (I) и в ранние сроки (II – через 1–2 недели после операции; III – через 1–3 мес. после травмы поясничного отдела позвоночника и спинного мозга)

В сроки 3–6 мес. данные ТМС и ССВП свидетельствовали о дальнейшем улучшении функций нисходящих и восходящих нервных путей СМ у пациентов обеих групп. Тем не менее характерными признаками электрофизиологического паттерна ССВП и МО, зарегистрированных у пациентов II группы, оставались значимые изменения таких характеристик, как уменьшение амплитуды вызванных ответов и удлинение латентного периода по сравнению с контролем, что указывало на сохранение нарушений проводниковой функции сенсорных и моторных нервных трактов у пациентов с осложненной травмой поясничного отдела позвоночника.

Заключение. Позвоночно-спинномозговая травма поясничной локализации сопровождается развитием реактивно-репаративных изменений в центральных и периферических структурах нейромоторного аппарата нижних конечностей, что динамично проявляется в сдвиге паттерна нейрофизиологических показателей. Анализ результатов комплексного нейрофизиологического исследования позволяет оценить степень нарушения функций СМ и его корешков при травматическом повреждении поясничного отдела позвоночника.

Установлено, что показатели суммарной и стимуляционной ЭМГ весьма информативны и позволяют выявить дефицит и степень контроля моторной функции мышц нижних конечностей при травматическом повреждении поясничного отдела позвоночника. Однако для прецизионной оценки функционального состояния центров спинного мозга после травмы целесообразно дополнить полученные результаты данными транскраниальной магнитной стимуляции и регистрации соматосенсорных вызванных потенциалов, которые обладают высокой стабильностью и специфичностью, поскольку дают количественную информацию о проводимости глубоко лежащих нервных трактов на различных сегментарных участках в остром и раннем периодах после травматического повреждения позвоночника и СМ.

Неосложненное повреждение поясничного отдела позвоночника в ранние сроки (1–3 мес.) сопровождается снижением рефлекторной возбудимости мышц (L_5-S_1) без нарушения проводниковой функции СМ и его корешков. При осложненной травме поясничного отдела позвоночника наблюдаются нарушения сегментарной и проводниковой функций СМ.

Наиболее информативным является комплексное применение методов электрофизиологического исследования, что позволяет проводить дифференциальную диагностику осложненной и неосложненной травмы поясничного отдела позвоночника, выявлять субклинические признаки поражения СМ и его корешков, дифференцировать спинальное и радикулярное поражение, оценивать динамику процесса и остаточную функцию СМ и его физиологические резервы при травматическом повреждении позвоночника.

Список использованной литературы

1. *Беляев, В. И.* Травма спинного мозга (диагностика, электростимуляционное и восстановительное лечение) / В. И. Беляев. – М., 2001. – 240 с.
2. *Смычек, В. Б.* Медицинская реабилитация пострадавших от позвоночно-спинальной травмы на этапах оказания специализированной медицинской помощи: инструкция по применению / В. Б. Смычек, Ю. В. Осипов, О. И. Дудуб. – Минск, 2009. – 28 с.
3. Возможности исследования соматосенсорных вызванных потенциалов при патологии позвоночника / А. А. Вишневецкий [и др.] // Хирургия позвоночника. – 2005. – № 3. – С. 101–110.
4. *Krause, P.* Repetitive magnetic and functional electrical stimulation reduce spastic tone increase in patients with spinal cord injury / P. Krause, F. Straube // Suppl. Clin. Neurophysiol. – 2003. – Vol. 56. – P. 220–225.
5. Role of motor evoked potentials in diagnosis of cauda equine and lumbosacral cord lesions / V. Di Lazzaro [et al.] // Neurology. – 2004. – Vol. 63 (12). – P. 2266–2271.
6. *Savic, G.* Prognosis and recovery in ischaemic and traumatic spinal cord injury // G. Savic, H. L. Frankel // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. – 1999. – Vol. 67, N 5. – P. 564–565.
7. *Denis, F.* The three column spine and its significance in the classification of acute thoracolumbar spinal injuries / F. Denis // Spine. – 1983. – N 8. – P. 817–831.
8. Практическое руководство по нейротравматологии / Ю. Г. Шанько [и др.]. – Минск: Белпринт, 2010. – 348 с.
9. *Плецинский, И. Н.* Спинальный мозг: афферентные взаимодействия / И. Н. Плещинский, Н. Л. Алексеева // Физиология человека. – 1996. – Т. 22, № 1. – С. 123–130.

Поступила в редакцию 04.07.2016

УДК 616.33-006.6-089.87-037(476)

М. Ю. РЕВТОВИЧ¹, А. И. ШМАК¹, О. В. КРАСЬКО², Р. М. СМОЛЯКОВА¹

ПРОТЕИН ТИРОЗИНФОСФАТАЗЫ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ДИССЕМИНАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕЗЕКТАБЕЛЬНЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА

¹*Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Беларусь, e-mail: mihail_revtovich@yahoo.com*
²*Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Исследован уровень экспрессии гена протеин тирозинфосфатазы (*PRL-3*) в первичной опухоли, париетальной брюшине различных отделов брюшной полости у 52 радикально оперированных пациентов, страдающих раком желудка. Определено пороговое значение уровня экспрессии гена *PRL-3*, позволяющее прогнозировать прогрессирование заболевания с формированием диссеминации опухоли по брюшине после хирургического лечения.

Ключевые слова: рак желудка, протеин тирозинфосфатазы, перитонеальная диссеминация.

M. Yu. REUTOVICH¹, A. I. SHMAK¹, O. V. KRASKO², R. M. SMOLYAKOVA¹

PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE IN THE PREDICTION OF PERITONEAL DISSEMINATION IN PATIENTS WITH RESECTABLE GASTRIC CANCER

¹*N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: mihail_revtovich@yahoo.com*
²*United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

The expression level of the protein tyrosine phosphatase gene (*PRL-3*) in the primary tumor and parietal peritoneum of 52 radically operated gastric cancer patients was investigated. The threshold value of *PRL-3* to predict the peritoneal dissemination after surgical treatment was defined.

Keywords: gastric cancer, protein tyrosine phosphatase, peritoneal dissemination.

Введение. Отдаленные результаты лечения рака желудка свидетельствуют об условной радикальности большинства выполняемых операций, поскольку прогрессирование заболевания после комбинированного и комплексного лечения является скорее правилом, чем исключением. Возможной причиной является интуитивный подход к до- и интраоперационному стадированию опухолевого процесса и к определению показаний для адъювантной химиотерапии. В этой связи для адекватного дооперационного стадирования опухолевого процесса представляется целесообразным использование молекулярно-биологических маркеров. Это позволит не только выявить наличие субклинических отдаленных метастазов на момент проведения хирургического лечения и на основании этого спрогнозировать развитие заболевания, но и индивидуализированно (с учетом уточненной степени распространенности опухолевого процесса) подойти к назначению адъювантной терапии.

Согласно литературным данным, одним из предикторов течения рака желудка является экспрессия гена протеина тирозинфосфатазы. Протеины тирозинфосфатазы (в англоязычной литературе – protein tyrosine phosphatase type IVA member 3 (*PTP4A3*) или phosphatase of regenerating liver-3 (*PRL-3*)) являются ключевыми регуляторами энзимов клеточных сигнальных путей, связанных с метастазированием [1, 2]. В частности, они регулируют фосфорилирование большинства ключевых сигнальных молекул и принимают участие в процессах клеточной дифференцировки и пролиферации [3]. Как показали результаты предыдущих исследований, гиперэкспрессия гена *PRL-3* связана с плохим прогнозом при ряде злокачественных опухолей [4–6], что

позволило рассматривать этот ген как маркер раннего метастазирования. Очевидно, определение экспрессии *PRL-3* у пациентов с резектабельным раком желудка может помочь в прогнозировании прогрессирования заболевания, а следовательно, и в разработке способов профилактики его прогрессирования. На сегодняшний день отсутствует единое мнение в отношении возможности использования *PRL-3* для этих целей. Наряду с сообщениями о более агрессивном течении рака желудка при гиперэкспрессии гена *PRL-3* в первичной опухоли [2, 7] высказываются предположения об отсутствии какой-либо связи между экспрессией данного гена и общей выживаемостью [5, 6], что обосновывает актуальность настоящего исследования.

Цель данного исследования – определить прогностическую значимость экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах различной локализации в развитии прогрессирования заболевания, включая перитонеальную диссеминацию, после хирургического лечения рака желудка.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования являлись образцы первичной опухоли (аденокарциномы желудка) и париетальной брюшины обеих куполов диафрагмы, боковых каналов, гипогастриальной области и малого таза 52 радикально оперированных пациентов в возрасте от 20 до 70 лет, страдающих раком желудка IIА–IIIС стадий (табл. 1).

Молекулярно-генетическое исследование экспрессии гена *PRL-3* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на амплификаторе iQ5 (Bio-Rad, США) с использованием реагентов Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas, Литва) согласно инструкции производителя. Степень очистки и концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра Varian Cary 50 (Agilent, США). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора реагентов High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. В работе использованы специфические олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые (FAM-BHQ1) TaqMan зонды компании-производителя ОДО «Прайм-тех» (Республика Беларусь): прямой праймер – GGGACTTCTCAGGTCGTGTC; обратный праймер – AGCCCCGTACTTCTTCAGGT; TaqMan зонд – FAM-TGGAGGTGAGCTACAACACATGCG-BHQ1 [8].

Т а б л и ц а 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Степень распространения опухолевого процесса/медиана наблюдений до события	К-во пациентов			
	всего	при прогрессировании заболевания	при прогрессировании заболевания с формированием диссеминации	в том числе умерших от прогрессирования опухолевого процесса
pT4a-bN2-3M0	22	14 (63,6 %)	9 (40,9 %)	7 (31,8 %)
pT4a-bN1M0	6	1 (16,7 %)	1 (16,7 %)	1 (16,7 %)
pT4a-bN0M0	8	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)
pT1-3N0-3M0	16	4 (25,0 %)	2 (12,5 %)	3 (18,8 %)
Всего	52	20 (38,5 %)	13 (25 %)	8 (23,1 %)
Медиана наблюдений до события*, дни		198	174	269
Медиана наблюдений**, дни		689	690	703

П р и м е ч а н и е. * – для пациентов с зарегистрированным прогрессированием заболевания; ** – для пациентов со стабилизацией процесса.

В качестве референсного гена применяли *SCARNA5* [9]. Для нормализации использовали усредненные значения Ср (кроссинг поинт) образцов ткани желудка, не имеющих признаков морфологического изменения. Для получения значений Ср применяли метод максимума второй производной кривых флуоресценции образцов [10]. В аналитической процедуре оценки экспрессии гена *PRL-3* на париетальной брюшине использовано максимальное из определенных значений экспрессии *PRL-3* для верхнего отдела брюшной полости (оба купола диафрагмы, оба боковых канала) и для нижнего отдела брюшной полости (малый таз, гипогастрий).

Количественные показатели экспрессии гена *PRL-3* подчинялись закону нормального распределения (критерий Шапиро–Уилка, $p > 0,05$) и представлены средним и стандартным отклонением (SD). Частотные характеристики выборки выражены количественными и процентными

величинами. Анализ влияния уровня экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах различных локализаций и степени распространенности опухолевого процесса, описываемой категориями T и N, на характер прогрессирования заболевания проводили с помощью лог-ранк критерия. Расчет уровня экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах, ассоциированного с неблагоприятным исходом, выполняли на основе алгоритма максимального ранга и статистики [11]. В многофакторный анализ риска развития перитонеальной диссеминации, который проводили также на основе регрессии пропорциональных рисков Кокса [12], наряду с категориями pT и pN, описывающими степень распространенности опухолевого процесса, включали показатель экспрессии гена *PRL-3*. Отношения рисков (ОР) рассчитывали как экспоненциальное преобразование соответствующих коэффициентов регрессии. Доверительные интервалы для ОР рассчитывали как экспоненциальное преобразование соответствующих доверительных интервалов коэффициентов регрессии.

Все расчеты производили в статистическом пакете R, версия 3.1.3, с использованием пакетов *survival* [13] и *maxstat* [14]. Результаты анализа считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При оценке отдаленных результатов лечения установлено, что прогрессирование заболевания (в том числе с формированием канцероматоза) наблюдалось при любой распространенности опухолевого процесса, в том числе и при отсутствии инвазии серозной оболочки (табл. 1). Как известно, распространение опухоли на серозную оболочку (pT4a) или переход ее на соседние структуры (pT4b) является фактором риска развития перитонеальной диссеминации [2]. В то же время наличие менее распространенного опухолевого процесса (pT1-3) не предотвратило формирование канцероматоза и ухудшение отдаленных результатов лечения. При оценке показателей кумулятивной выживаемости в подгруппах, разделенных по критерию pT (pT1-3 против pT4a-b) лог-ранговые критерии для выживаемости, свободной от прогрессирования, и выживаемости, свободной от диссеминации, составили 0,113 и 0,170 соответственно (рис. 1).

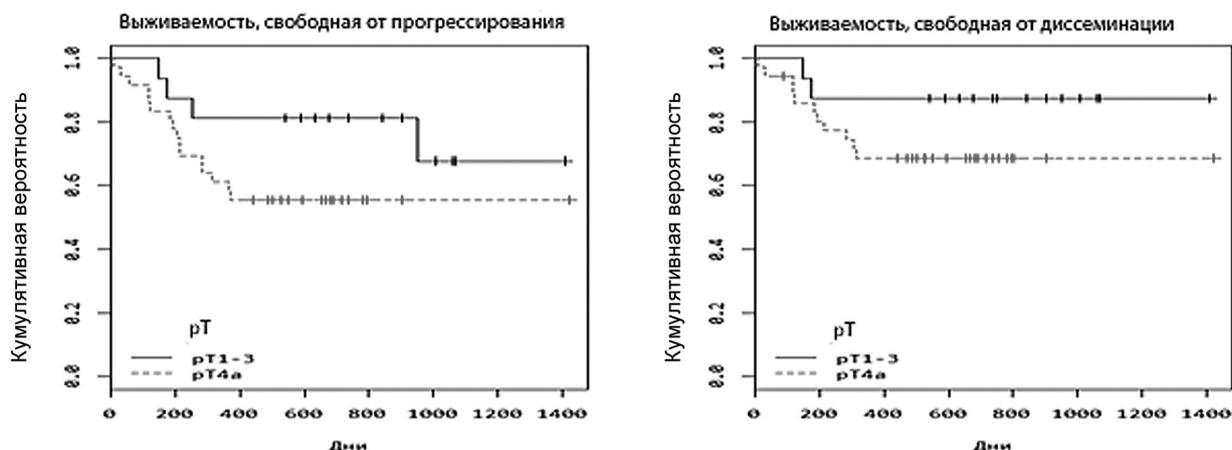


Рис. 1. Кумулятивная выживаемость пациентов с резектабельным раком желудка при различной степени инвазии (pT) стенки желудка

Напротив, степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора оказывала влияние на отдаленные результаты лечения – увеличение степени метастатического поражения (pN2-3) привело к ухудшению показателей свободной от прогрессирования ($p_{\log\text{-rank}} = 0,002$) и свободной от диссеминации ($p_{\log\text{-rank}} = 0,042$) выживаемости (рис. 2).

Возможным объяснением может быть более интенсивное поступление опухолевых клеток в свободную брюшную полость из пересеченных лимфатических сосудов в процессе выполнения лимфодиссекции у пациентов с pN2-3, что увеличивает риск и частоту развития диссеминации опухоли по брюшине [15, 16]. Вторым возможным объяснением является более интенсивная (в сравнении с pN0-1) гематогенная диссеминация опухолевых клеток в случае более распространенного опухолевого процесса, соответствующего pN2-3.

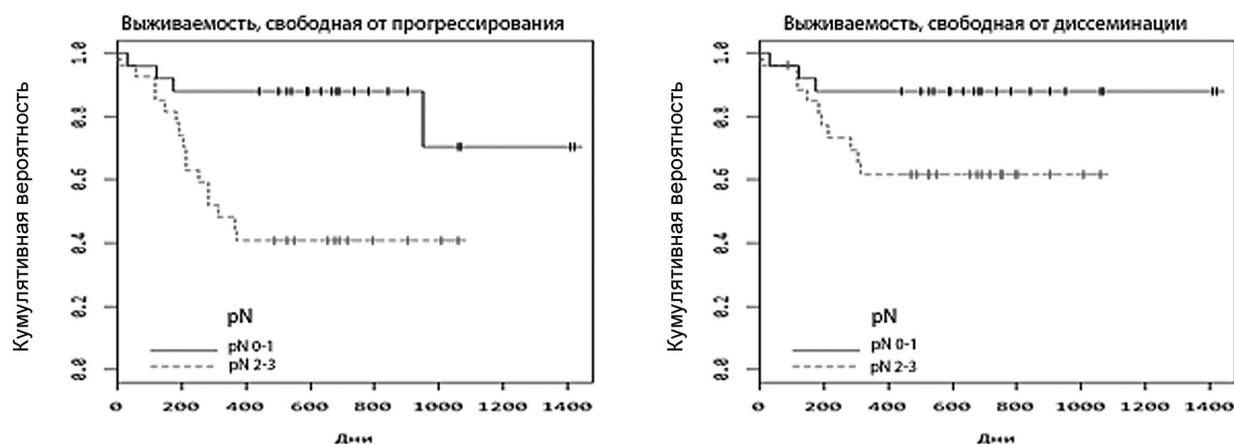


Рис. 2. Кумулятивная выживаемость у пациентов с резектабельным раком желудка при различной степени метастатического поражения (pN) регионарного лимфоколлектора

Если рассматривать возможность использования для прогнозирования указанные выше категории pT и pN, то в отношении pT можно заключить, что отсутствие статистически значимых различий в показателях кумулятивной выживаемости, свободной от прогрессирования и свободной от диссеминации, может свидетельствовать о недостаточной прогностической значимости категории pT. В сравнении с категорией pT категория pN в нашем исследовании лучше прогнозировала клиническое течение заболевания после хирургического лечения. Однако, как следует из информации, приведенной в табл. 1, использование только этих данных лишь приблизительно позволяет оценить возможность прогрессирования заболевания, поскольку даже при массивном метастатическом поражении регионарного лимфоколлектора имели место случаи стабилизации процесса в отсутствие адъювантного лечения. То есть, в одних случаях этот процесс ограничивался формированием регионарных лимфогенных метастазов, а в других он приобретал характер системного заболевания с развитием отдаленных лимфогематогенных и/или имплантационных метастазов. Это свидетельствует о том, что возможность системного прогрессирования заболевания определяется особенностями биологии аденокарциномы каждого конкретного пациента, а именно наличием так называемого «агрессивного» фенотипа последней, обуславливающего высокую склонность к метастазированию. Это послужило основанием для оценки возможностей использования уровня экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах различной локализации для прогнозирования клинического течения заболевания после проведения хирургического лечения.

Для оценки возможности использования *PRL-3* в качестве предиктора течения заболевания нами определены значения его экспрессии в биоптатах различной локализации и их взаимосвязь с клиническим течением заболевания (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Экспрессия гена *PRL-3* у пациентов с резектабельным раком желудка в биоптатах различной локализации

Анализируемый биоптат	Экспрессия гена <i>PRL-3</i> в биоптатах, отн. ед. (среднее – SD)
Первичная опухоль (n = 36)	4,9 (2,9)
Париетальная брюшина диафрагмы и боковых каналов (n = 29)	4,1 (3,5)
Париетальная брюшина малого таза (n = 33)	3,6 (3,5)

Из 36 пациентов с экспрессией *PRL-3* в первичной опухоли у 15 (41,7 %) отмечалось прогрессирование заболевания в том или ином варианте. Аналогичным образом из 29 пациентов с экспрессией *PRL-3* в париетальной брюшине диафрагмы и боковых каналов прогрессирование заболевания наблюдалось у 11 (37,9 %), а из 28 пациентов с экспрессией *PRL-3* в париетальной брюшине малого таза и гипогастрия – у 12 (42,9 %).

При оценке влияния уровня экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах различной локализации на развитие прогрессирования заболевания (вне зависимости от его варианта – отдаленные лимфогематогенные метастазы или диссеминация опухоли по брюшине) по результатам однофакторного анализа какой-либо зависимости не установлено. Однако при оценке влияния экспрессии гена *PRL-3* на формирование канцероматоза брюшины установлено, что высокие значения экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах париетальной брюшины диафрагмы и боковых каналов увеличивали риск развития диссеминированного поражения брюшины после хирургического лечения, что негативно повлияло на отдаленные результаты лечения (табл. 3, рис. 3).

Т а б л и ц а 3. Пороговый уровень экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах различной локализации для оценки риска развития перитонеальной диссеминации после хирургического лечения рака желудка по результатам однофакторного анализа

Анализируемый биоптат	К-во наблюдений/ к-во событий	Результаты однофакторного анализа		
		Пороговый уровень экспрессии <i>PRL-3</i> , отн. ед.	<i>p</i>	ОР (95 % ДИ)
Первичная опухоль	36/12	–	NS	–
Париетальная брюшина диафрагмы и боковых каналов	29/9	≤2	0,018	6,7 (1,4–32,2)
Париетальная брюшина малого таза и гипогастрия	28/10	–	NS	–

Пр и м е ч а н и е. NS – различия статистически незначимы.

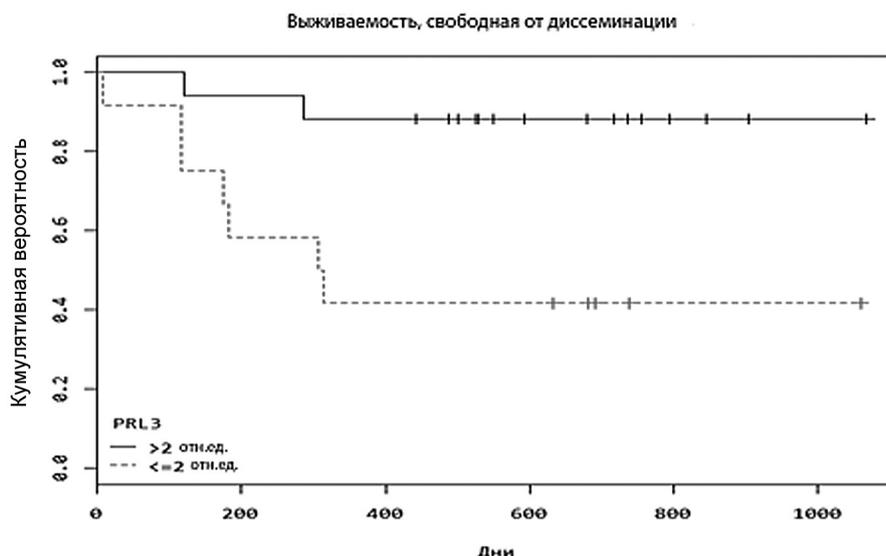


Рис. 3. Кумулятивная выживаемость, свободная от диссеминации, у пациентов с резектабельным раком желудка при различной экспрессии гена *PRL-3* в париетальной брюшине диафрагмы и боковых каналов ($p_{\log\text{-rank}} = 0,007$)

Показатели, статистически значимо влиявшие на характер прогрессирования по результатам однофакторного анализа, были включены в многофакторный анализ. По результатам последнего установлено, что риск развития диссеминированного поражения брюшины после радикального хирургического лечения рака желудка в 7,3 раза выше у пациентов, у которых уровень экспрессии гена *PRL-3* в париетальной брюшине верхних отделов брюшной полости превышает установленное в данном исследовании пороговое значение (≤ 2 отн. ед.) (табл. 4).

Согласно данным, представленным в табл. 4, традиционно применяющиеся для прогнозирования клинического течения заболевания категории *pT* и *pN* классификации *pTNM* не продемонстрировали прогностической значимости в настоящем исследовании. Это подтверждает мнение N. Dai и соавт. (2009) [1] о недостаточной адекватности использования классификации *pTNM* для прогнозирования клинического течения заболевания у пациентов, страдающих

Т а б л и ц а 4. Многофакторный анализ (Кокс-регрессия) зависимости прогрессирования заболевания с развитием перитонеальной диссеминации от уровня экспрессии гена *PRL-3* и степени распространенности опухолевого процесса

Показатели, ассоциированные с неблагоприятным исходом	Результаты регрессионного анализа		
	β	<i>p</i>	ОР (95 % ДИ)
Пороговый уровень экспрессии <i>PRL-3</i> в париетальной брюшине диафрагмы и боковых каналов ≤ 2 отн. ед.	1,99	0,017	7,3 (1,4–37,4)
pN2-3 против pN0-1	0,61	0,483	1,8 (0,3–10,3)
pT4 против pT1-3	1,25	0,273	3,5 (0,3–33,1)

раком желудка II–III стадии. В то же время результаты многофакторного анализа свидетельствуют о том, что определение экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах париетальной брюшины диафрагмы и боковых каналов позволяет прогнозировать перитонеальную диссеминацию при наличии в них уровня экспрессии ≤ 2 отн. ед. Следует обратить внимание на тот факт, что приведенное выше значение экспрессии гена *PRL-3* отмечалось в биоптатах париетальной брюшины не только у пациентов с инвазией опухолью серозной оболочки (pT4a-b) и имеющих высокий риск прогрессирования с формированием канцероматоза [2], но и у лиц, у которых инвазия опухоли серозной оболочки (pT1-3) отсутствовала. Следовательно, с учетом результатов проведенного нами многофакторного анализа, определение экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах париетальной брюшины для прогнозирования прогрессирования рака желудка после хирургического лечения представляется более целесообразным, чем традиционно используемые для этой цели категории классификации pTNM.

В доступной нам литературе сведений о результатах влияния экспрессии гена *PRL-3* в париетальной брюшине на выживаемость, свободную от диссеминации, нами не обнаружено. Приведенные нами данные представляют интерес потому, что в исследование были включены только пациенты без макроскопических признаков перитонеальной диссеминации. Принимая во внимание тот факт, что экспрессия *PRL-3* наблюдается преимущественно в опухолевой ткани [17], можно предположить, что у обследованных нами пациентов имела место субклинически протекающая перитонеальная диссеминация, в последующем реализовавшаяся клинически только у лиц с высоким уровнем экспрессии гена *PRL-3*, определенного в настоящем исследовании как пороговый. Следует отметить, что развитие данного варианта прогрессирования отмечалось при любой распространенности опухолевого процесса, в том числе у пациентов, традиционно считающихся наименее угрожаемыми по данному варианту прогрессирования (без инвазии опухолью серозной оболочки желудка). При этом фактором, определяющим неблагоприятный в плане формирования канцероматоза прогноз, выступала только экспрессия *PRL-3* на париетальной брюшине диафрагмы и боковых каналов.

О взаимосвязи экспрессии гена *PRL-3* в первичной опухоли с развитием перитонеальной диссеминации сообщали многие авторы [7, 18], однако ни в одном из исследований не отмечено влияния *PRL-3* на выживаемость. Так, подавление экспрессии гена *PRL-3* в эксперименте *in vivo* приводило к торможению роста диссеминатов на париетальной брюшине [18]. Z. R. Li и соавт. (2007) [7] сообщили о том, что уровень экспрессии гена *PRL-3* в первичной опухоли коррелировал с частотой развития перитонеальной диссеминации. Согласно результатам проведенного авторами исследования, уровень экспрессии гена *PRL-3* в клинически определяемых диссеминатах выше такового в первичной опухоли, что соответствует полученным нами результатам. По мнению Z. R. Li и соавт. (2007) [7], биохимические механизмы влияния *PRL-3* на развитие диссеминации опухоли по брюшине нуждаются в уточнении. Возможно, гиперэкспрессия гена *PRL-3* сопровождается увеличением подвижности опухолевых клеток и их способности к инвазии, что в целом располагает к формированию отдаленных метастазов, включая имплантационные [19].

Заключение. Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что оценка экспрессии гена *PRL-3* в биоптатах париетальной брюшины диафрагмы и боковых каналов может использоваться для прогнозирования развития канцероматоза после ради-

кального хирургического лечения рака желудка. Наличие экспрессии, превышающей пороговое значение, определенное в данном исследовании, свидетельствует о высоком риске формирования перитонеальной диссеминации и может использоваться для персонифицированного подхода при определении показаний для адъювантной интраперитонеальной химиотерапии у пациентов, которые страдают раком желудка и у которых распространенность опухолевого процесса соответствует pT1-4N0-3M0 и высок риск данного варианта прогрессирования заболевания.

Список использованной литературы

1. Expression of phosphatase regenerating liver 3 is an independent prognostic indicator for gastric cancer / N. Dai [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 15, N 12. – P. 1499–1505.
2. Prognosis of phosphatase of regenerating liver 3 expression in gastric cancer: a meta-analysis / L. Hu [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8 (10): e76927. doi: 10.1371/Journal.pone.0076927.
3. *Al-Aidaros, A. Q.* PRL-3 phosphatase and cancer metastasis / A. Q. Al-Aidaros, Q. Zeng // *J. Cell. Biochem.* – 2010. – Vol. 111. – P. 1087–1098.
4. Prognostic value of PRL-3 overexpression in early stages of colonic cancer / X. Xing [et al.] // *Histopathology.* – 2009. – Vol. 54. – P. 309–318.
5. PTP4A3 (PRL-3) expression correlate with lymphatic metastases in gastric cancer / A. Pryczynicz [et al.] // *Folia Histochem. Cytobiol.* – 2010. – Vol. 48, N 4. – P. 632–636.
6. High PRL-3 expression in human gastric cancer is a marker of metastasis and grades of malignancies: an in situ hybridization study / U. A. Miskad [et al.] // *Virchows Arch.* – 2007. – Vol. 450, N 3. – P. 303–310.
7. Association of tyrosine PRL-3 phosphatase protein expression with peritoneal metastasis of gastric carcinoma and prognosis / Z. R. Li [et al.] // *Surg. Today.* – 2007. – Vol. 37. – P. 646–651.
8. Overexpression and involvement in migration by the metastasis-associated phosphatase PRL-3 in human myeloma cells / F. Unn-Merete [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, N 2. – P. 806–815.
9. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up / A. Tichopad [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2003. – Vol. 31, N 20. – e122. doi: 10.1093/nar/gng122.
10. Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR / Ch. R. Galiveti [et al.] // *RNA.* – 2010. – Vol. 16, N 2. – P. 450–461.
11. Assessment of optimally selected prognostic factors / B. Lausen [et al.] // *Biometr. J.* – 2004. – Vol. 46, N 3. – P. 364–374.
12. *Therneau, T.* A package for survival analysis in S_ version 2.38 [Электронный ресурс] / T. Therneau. – 2015. – Mode of access: <http://CRAN.R-project.org/package=survival>. – Date of access: 12.02.2016.
13. *Andersen, P.* Cox's regression model for counting processes, a large sample study / P. Andersen, R. Gill // *Annals of Statistics.* – 1982. – Vol. 10. – P. 1100–1120.
14. *Hothorn, T.* Maxstat: maximally selected rank statistics. R package version 0.7-22 [Электронный ресурс] / T. Hothorn. – 2015. – Mode of access: <http://CRAN.R-project.org/package=maxstat>. – Date of access: 18.02.2016.
15. Mechanisms of peritoneal metastasis after operation for non-serosa invasive gastric carcinoma: an ultrarapid detection system for intraperitoneal free cancer cells and a prophylactic strategy for peritoneal metastasis / T. Marutsuka [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9. – P. 678–685.
16. Peritoneal washing cytology: prognostic value of positive findings in patients with gastric carcinoma undergoing a potentially curative resection / Y. Kodera [et al.] // *J. Surg. Oncol.* – 1999. – Vol. 72. – P. 60–65.
17. Phosphatase of regenerating liver-3 as a prognostic biomarker in histologically node-negative gastric cancer / A. Ooki [et al.] // *Oncol. Reports.* – 2009. – Vol. 21. – P. 1467–1475.
18. Inhibition of PRL-3 gene expression in gastric cancer cell line SGC7901 via microRNA suppressed reduces peritoneal metastasis / Z. Li [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 348. – P. 229–237.
19. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells / X. Wu [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2004. – Vol. 164, N 6. – P. 2039–2054.

Поступила в редакцию 04.06.2016

УДК 617.713-007.17-056.7-085.849.19

Д. Е. АБЕЛЬСКИЙ

**СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПЕРАЦИИ ФЕМТО-ЛАСИК
ПО СТАНДАРТНОМУ И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОМУ
ПО ЗНАЧЕНИЯМ АБЕРРАЦИЙ ВЫСШИХ ПОРЯДКОВ ПРОТОКОЛАМ АБЛЯЦИИ**

*Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь, e-mail: abelskid@yandex.ru*

Проведено сравнение результатов операций фемто-ЛАСИК по стандартному и персонализированному по значениям аббераций высших порядков протоколам абляции у пациентов в сопоставимых группах, сформированных методом отбора подобного по вероятности. Не установлено статистически значимых различий по достигаемой рефракции, остроте зрения и степени улучшения качества жизни, связанного со зрением, однако персонализированная операция дала статистически значимо лучшие результаты по показателям индукции аббераций высших порядков пациентам с ухудшением качества зрения и физическим дискомфортом в области глаз после операции. Выполнение персонализированного фемто-ЛАСИК не гарантировало удовлетворенности пациентов результатами вмешательства в 100 % случаев.

Ключевые слова: фемто-ЛАСИК, абберации высших порядков, отбор подобного по вероятности.

D. ABELSKI

STANDARD AND CUSTOMIZED WAVEFRONT-GUIDED FEMTO-LASIK RESULTS COMPARISON

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus, e-mail: abelskid@yandex.ru

The results of standard and customized wavefront-guided femto-LASIK evaluation in comparable groups formed with propensity score matching method are presented in this article. No statistically significant postoperative difference in achieved refraction, visual acuity and visual life quality improvement was registered, nevertheless customized operation showed lower values of higher-order aberrations induction and amount of patients with vision quality deterioration and physical ocular discomfort occurrence postoperatively. Performing customized femto-LASIK nevertheless did not guarantee 100 % postoperative patient satisfaction with achieved results.

Keywords: femto-LASIK, higher-order aberrations, propensity score mathing.

Введение. Наиболее точными и наименее инвазивными методами хирургической коррекции аномалий рефракции на сегодняшний день являются методы, основанные на применении эксимерного лазера для изменения кривизны передней поверхности роговицы. До недавнего времени самой распространенной эксимерлазерной рефракционной операцией оставался лазерный *in situ* кератомилез (ЛАСИК) [1]. На первом этапе операции ЛАСИК выполняется формирование лоскута роговицы при помощи автоматического режущего инструмента – микрокератома. Лоскут смещается в сторону, а его стромальное ложе подвергается фотоабляции эксимерным лазером по заданному протоколу. Затем лоскут репозиционируется, покрывая стромальную поверхность. Наличие роговичного лоскута позволяет значительно сократить (до 1 сут) сроки заживления и снизить выраженность и длительность (до 3–4 ч после операции) болевых ощущений [2].

Большинство интраоперационных осложнений возникает на этапе работы микрокератома. В частности, отмечаются формирование лоскута неправильной конфигурации и с дефектами, полный срез и потеря лоскута, формирование лоскута избыточной толщины или диаметра (с повреждением лимбальной зоны и сосудов конъюнктивы), перфорация роговицы и др. [3]. Приме-

нение фемтосекундного лазера для формирования роговичного лоскута при операции ЛАСИК значительно повысило безопасность вмешательства за счет отсутствия прямого механического воздействия на роговицу, а биомеханические и оптические свойства полученного лоскута снизили количество индуцируемых процедурой аберраций высших порядков (АВП) [4].

Фемтосекундный лазер по сути является сверхточным бесконтактным скальпелем, позволяющим формировать разрезы роговицы различной конфигурации на любой глубине без повреждения вышележащих слоев. Однако, несмотря на значительные преимущества по сравнению с другими методиками, результат лазерного *in situ* кератомилеза с применением фемтосекундного лазера для формирования роговичного лоскута (фемто-ЛАСИК) в некоторых случаях не оправдывает ожиданий пациентов, желающих улучшить после операции не только остроту, но и качество зрения (КЗ) по сравнению с дооперационными с помощью нехирургических средств коррекции (очков, контактных линз), без ухудшения сумеречного и ночного зрения, возникновения различных оптических феноменов вокруг источников света ночью (ореолы, лучистость, рябь), что нередко описывается пациентами после операции [5]. Причиной снижения КЗ может служить индукция определенного количества АВП в ходе самой эксимерлазерной абляции [6]. Неудовлетворенность пациентов после вмешательства бывает обусловлена также наличием физического дискомфорта (ФД) в области глаз, причиной которого зачастую является синдром «сухого глаза», возникающий в результате нарушения обменных процессов и иннервации роговицы после интраоперационного повреждения тканей [7].

С целью снижения послеоперационных показателей АВП производителями лазеров предложена оперативная методика с фемтолазерным формированием роговичного лоскута и алгоритмом эксимерлазерной абляции, который помимо привычных значений аберраций нижних порядков (дефокусировка, астигматизм) учитывает и предоперационные АВП (АВП-фемто-ЛАСИК) [8]. Технология «летающего пятна» с малой (0,5–1 мм) площадью лазерного воздействия позволяет в указанном выше случае сформировать уникальную, персонализированную оптику роговицы. Новые методики в рефракционной хирургии активно рекламируются в средствах массовой информации, поэтому пациенты ожидают от врача чуть ли не «предоставления гарантии» значимого повышения уровня КЗ после операции. Однако в реальной клинической практике результаты применения новейших методов не всегда гарантируют получения абсолютного КЗ, и пациенты нередко выражают свою неудовлетворенность в послеоперационном периоде.

Оценка и сравнение эффективности рефракционных операций в условиях повседневной клинической практики является сложной задачей, так как исключить систематическую ошибку и достичь сопоставимости групп исследования по всем параметрам, потенциально влияющим на результат вмешательства, практически невозможно. Метод отбора подобного по вероятности (ОПВ) – наиболее современный статистический метод, который корректирует различия в характеристиках двух групп пациентов, получивших различные виды вмешательства, и позволяет сформировать группы, сопоставимые по всем заданным параметрам [9–11].

Цель настоящего исследования – оценка объективных и субъективных результатов операций фемто-ЛАСИК и АВП-фемто-ЛАСИК в сопоставимых по основным исходным параметрам группах пациентов, сформированных с помощью метода отбора подобного по вероятности.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили данные 151 пациента с диагнозом «миопия и/или миопический астигматизм» после проведения операций фемто-ЛАСИК и АВП-фемто-ЛАСИК на лазерном комплексе VISX STAR[®] 4 IR + Intralase[®] FS 60 (производство Abbott Medical Optics[®], США). В исследование не были включены пациенты с простым, сложным и смешанным гиперметропическим астигматизмом, гиперметропией, средней и высокой степенью амблиопии, помутнением роговицы или хрусталика, предшествующими операциями на роговице или хрусталике.

До операции всем пациентам выполнен комплекс обследований, включающий определение некорригированной остроты зрения (НОЗ), наилучшей корригированной остроты зрения (НКОЗ) и клинической рефракции (сферический компонент, цилиндрический компонент, сферический эквивалент), измерение аберраций волнового фронта оптической системы глаза – абберрометрию (абберрометр WaveScan WaveFront[®] System) и оценку значений общих АВП и ее наиболее выра-

женных видов (сферических Z_{40} , комы Z_{31} и трилистника Z_{33}). Собран полный офтальмологический анамнез, в том числе данные о характере зрительных нагрузок (ХЗН) и используемой ранее коррекции. Пациенты ответили на вопросы опросника NEI-VFQ-25 (25 item National Eye Institute Visual Function Questionnaire) (VFQ) о качестве жизни, обусловленном состоянием зрения, а также на вопросы о наличии ФД в области глаз и качественных изменениях зрения, не связанных с его остротой. Через 6 мес. после операции проведено контрольное обследование в том же объеме.

Статистическая обработка выполнена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к медико-биологическим исследованиям [12]. Критерии хи-квадрат с поправкой Йетса и точный критерий Фишера использованы для сравнения двух независимых групп по качественным показателям, непараметрические U -критерий Манна–Уитни и критерий Вилкоксона – для сравнения двух групп по количественным показателям (независимым и зависимым соответственно) [13]. Для дихотомических показателей результатов рассчитан 95 %-ный доверительный интервал (ДИ) разности.

Для формирования сопоставимых групп применен метод Propensity score matching (PSM) – ОПВ. Метод основан на расчете вероятности для каждого пациента попасть в группу, где проводился тот или иной вид вмешательства, с использованием мультивариантной логистической регрессии с заданными исходными характеристиками пациентов в качестве предикторов. Из анализа исключены пациенты, у которых хотя бы по одному предиктору данные отсутствовали. В настоящем исследовании выбрана процедура отбора «ближайшего соседа», или «ближайшего подобного», в соотношении 1:2 для групп с операциями АВП-фемто-ЛАСИК и фемто-ЛАСИК соответственно [14, 15].

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все значения p были двусторонними. Статистическая обработка результатов исследования выполнена в программе SPSS 23.0 с модулем R 3.1.0.

Результаты и их обсуждение. Операция фемто-ЛАСИК проведена 101 пациенту (202 глаза) (группа 1), АВП-фемто-ЛАСИК – 50 пациентам (100 глаз) (группа 2). Из них мужчин было 64 (42,4 %), женщин – 87 (57,6 %). Медиана возраста составила 29 лет (от 18 до 48 лет). Степень миопии определена как высокая в 67 (22,2 %) случаях, как средняя – в 139 (46,0 %), как низкая – в 96 (31,8 %) случаях. Характер преобладающих повседневных зрительных нагрузок у 5 (3,3 %) пациентов оценили как преимущественно связанные со зрением вдаль, у 41 (27,2 %) – со зрением вблизи (до 1 м), у 105 (69,5 %) – как смешанные. В качестве средств коррекции 51,7 % пациентов использовали очки, 36,4 % – контактные линзы (КЛ), очки и КЛ попеременно – 7,9 %. Не использовали никаких средств коррекции 6 (4,0 %) пациентов.

Проверка на сопоставимость групп пациентов после фемто-ЛАСИК и АВП-фемто-ЛАСИК показала наличие статистически значимых различий по ряду показателей, потенциально влияющих на объективные (оцениваемые врачом) и субъективные (оцениваемые пациентом) результаты операции (табл. 1). Наиболее существенно группы различались по исходной рефракции: медиана сферического эквивалента (СЭ) рефракции в группе 1 составила $-4,75$ дптр. (от $-1,0$ до $-10,4$ дптр.), в группе 2 – $-3,63$ дптр. (от $-0,38$ до $-11,0$ дптр.) ($p < 0,001$). По данным aberromетрии, статистически значимые различия отмечены по сферическим аберрациям (Z_{40}): в группе 1 медиана составила $0,04$ мкм, в группе 2 – $-0,02$ мкм ($p < 0,001$). Группы также различались по наличию ФД в области глаз: в группе 1 ФД наблюдался в 38 (18,8 %) из 202 случаев, в группе 2 – в 7 (7 %) из 100 ($p = 0,011$). Таким образом, пациенты, выбравшие операции фемто-ЛАСИК и АВП-фемто-ЛАСИК, статистически значимо различались как по объективным, так и по субъективным параметрам, причем по всем из них смещение отмечалось в сторону лучших значений в группе лиц, которым проведена операция АВП-фемто-ЛАСИК.

Для получения групп, сопоставимых по всем показателям, применен ОПВ-анализ, основанный на методе логистической регрессии [10]. Отбор пациентов (глаз) проведен по следующим показателям: пол, возраст, характер зрительных нагрузок, СЭ, НОЗ, общие АВП, сферические АВП (Z_{40}), общий балл опросника VFQ, наличие жалоб на КЗ, наличие ФД. В результате из исходных групп методом ОПВ были выделены 55 пациентов (110 глаз) с операцией фемто-ЛАСИК (группа 1а) и 33 пациента (66 глаз) с операцией АВП-фемто-ЛАСИК (группа 2а), сопоставимые по указанным показателям (табл. 2). Необходимо отметить, что для 17 пациентов группы 2

Т а б л и ц а 1. Демографические и клинические данные исходных и полученных в результате ОПВ-анализа групп пациентов

Показатель	Вся когорта			ОПВ		
	Фемто-ЛАСИК (n = 101)	АВП-фемто-ЛАСИК (n = 50)	p-уровень	Фемто-ЛАСИК (n = 55)	АВП-фемто-ЛАСИК (n = 33)	p-уровень
Пол, n (%):						
мужчины	44 (43,6)	20 (40,0)	0,809	24 (44)	15 (45)	0,956
женщины	57 (56,4)	30 (60,0)		31 (56)	18 (55)	
Возраст, лет	29	30	0,138	28	30	0,459
Ме LQ/UQ	24/32	26/33		24/32	25/32	
ХЗН, n (%):						
вблизи	41 (27,2)	10 (20,0)	0,189	12 (22)	9 (27)	0,826
вдаль	5 (3,3)	3 (6,0)		2 (4)	1 (3)	
смешанные	105 (69,5)	37 (74,0)		41 (74)	23 (70)	
Коррекция, n (%):						
очки (О)	50 (49,5)	28 (56,0)	0,886	27 (49)	17 (52)	0,718
линзы (КЛ)	38 (37,6)	17 (34,0)		21 (38)	14(42)	
О + КЛ	9 (8,9)	3 (6,0)		4 (7)	2 (6)	
без коррекции	4 (4,0)	2 (4,0)		3 (6)	0 (0)	
VFQ, балл, Ме	68,4	71,1	0,166	70,7	74,1	0,629

П р и м е ч а н и е. ХЗН – характер зрительных нагрузок, VFQ – опросник NEI-VFQ-25.

Т а б л и ц а 2. Характеристика исходных и полученных в результате ОПВ-анализа групп пациентов

Показатель	Вся когорта			ОПВ		
	Фемто-ЛАСИК (n = 202)	АВП-фемто-ЛАСИК (n = 100)	p-уровень	Фемто-ЛАСИК (n = 110)	АВП-фемто-ЛАСИК (n = 66)	p-уровень
СЭ, дптр., Ме LQ/UQ	-4,75 -3,00/-6,13	-3,63 -2,50/-5,25	<0,001	-3,84 -2,63/-5,00	-4,00 -3,00/-5,75	0,511
НОЗ, Ме LQ/UQ	0,09 0,07/0,10	0,095 0,08/0,10	0,091	0,10 0,08/0,10	0,09 0,08/0,10	0,383
АВП _{сумм} , Ме LQ/UQ	0,27 0,21/0,36	0,32 0,21/0,40	0,132	0,30 0,22/0,36	0,27 0,19/0,36	0,359
АВП Z ₄₀ , Ме LQ/UQ	0,04 -0,05/0,12	-0,02 -0,11/0,06	<0,001	0,01 -0,07/0,09	-0,01 -0,08/0,06	0,310
АВП Z ₃₃ , Ме LQ/UQ	0,12 0,08/0,18	0,13 0,08/0,20	0,469	0,14 0,09/0,19	0,13 0,07/0,20	0,655
АВП Z ₃₁ , Ме LQ/UQ	0,13 0,08/0,20	0,14 0,08/0,25	0,253	0,13 0,09/0,22	0,12 0,07/0,24	0,621
КЗ, n (%):						
нет	178 (88,1)	83 (83,0)	0,297	94 (85)	58 (85)	0,820
есть	24 (11,9)	17 (17,0)		16 (15)	8 (12)	
ФД, n (%):						
нет	164 (81,2)	93 (93,0)	0,011	89 (81)	59 (89)	0,202
есть	38 (18,8)	7 (7,0)		21 (19)	7 (11)	

П р и м е ч а н и е. СЭ – сферический эквивалент рефракции, НОЗ – некорригированная острота зрения, АВП_{сумм} – суммарное значение аберраций высших порядков, АВП – аберрации высших порядков, КЗ – жалобы на качество зрения, не связанное с его остротой, ФД – физический дискомфорт в области глаз.

в группе 1 не нашлось ни одного пациента со схожими дооперационными параметрами, а для 11 пациентов группы 2 в группе 1 было выбрано только по одному аналогичному пациенту, что дополнительно подчеркивает наличие существенных различий в исходных группах.

Далее нами проведен анализ всех исследуемых объективных и субъективных результатов операций, полученных с помощью метода ОПВ и сопоставимых по всем измеряемым показателям, в группах пациентов. В обеих группах у большинства пациентов была достигнута эмметропическая рефракция: на 78 (70,9 %) из 110 глаз в группе 1а и на 49 (74 %) из 66 глаз в груп-

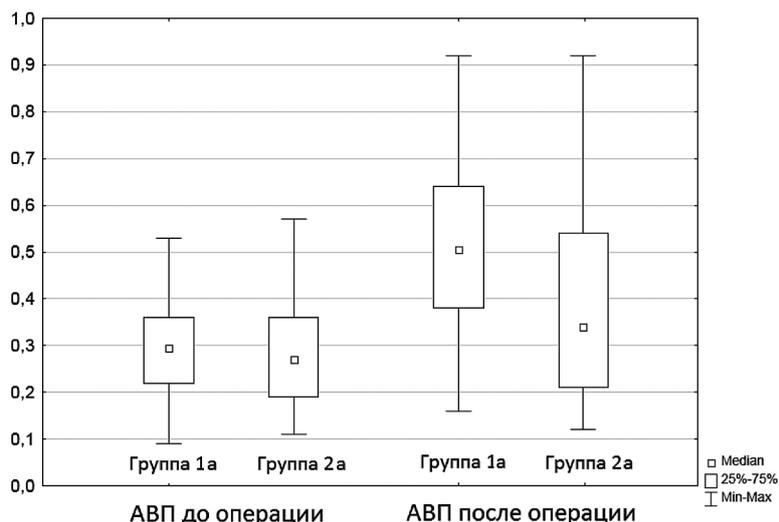


Рис. 1. Распределение общих значений АВП в сопоставимых группах до и после операции

пе 2а ($p = 0,931$). Медиана СЭ в группе 1а составила 0,0 дптр. (интерквартильный диапазон $-0,25-0,00$ дптр.), в группе 2а – 0,0 дптр. (интерквартильный диапазон $-0,125-0,00$ дптр.) ($p = 0,722$). НОЗ после вмешательства, равная 1,0 и более, отмечалась на 77 (70 %) из 110 глаз в группе 1а и на 49 (74 %) из 66 глаз в группе 2а ($p = 0,666$), от 0,55 до 0,8 – на 8 (7 %) из 110 и 6 (9 %) из 66 глаз соответственно ($p = 0,886$). В 80 (73 %) из 110 случаев в группе 1а и в 55 (83 %) из 66 случаев в группе 2а ($p = 0,154$) после операции зафиксирована НОЗ, равная или больше, чем НКОЗ до операции.

Анализ АВП показал, что увеличение общих АВП было статистически значимым ($p < 0,001$) в обеих группах, но в группе 2а существенно и статистически значимо меньше ($p < 0,001$) (рис. 1). Если медиана АВП в группах до операции составила 0,30 мкм (интерквартильный диапазон 0,22–0,36 мкм) и 0,27 мкм (интерквартильный диапазон 0,19–0,36 мкм), то после операции – 0,51 мкм (0,38–0,64 мкм) и 0,34 мкм (0,21–0,54 мкм) соответственно.

АВП Z_{40} и Z_{31} увеличились статистически значимо в обеих группах ($p < 0,001$), но в группе 2 статистически значимо меньше ($p < 0,001$ для АВП Z_{40} и $p = 0,007$ для АВП Z_{31}) (рис. 2). Изменение величины АВП Z_{33} было статистически незначимо в обеих группах – $p = 0,651$ в группе 1а и $p = 0,120$ в группе 2а.

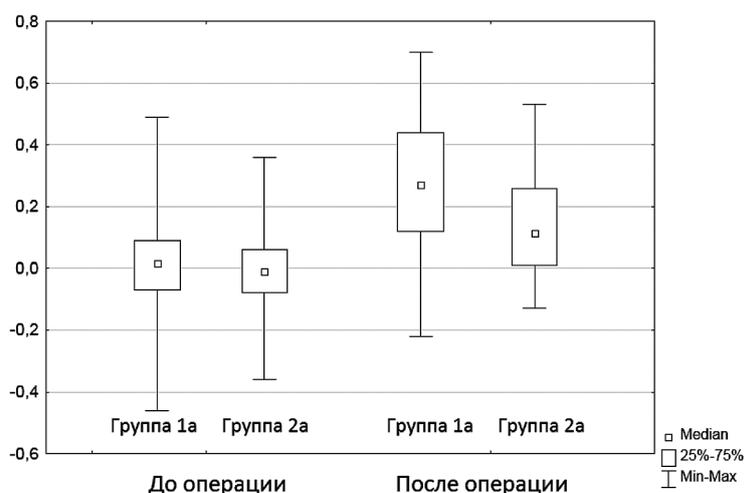


Рис. 2. Распределение сферических АВП (Z_{40}) в сопоставимых группах до и после операции

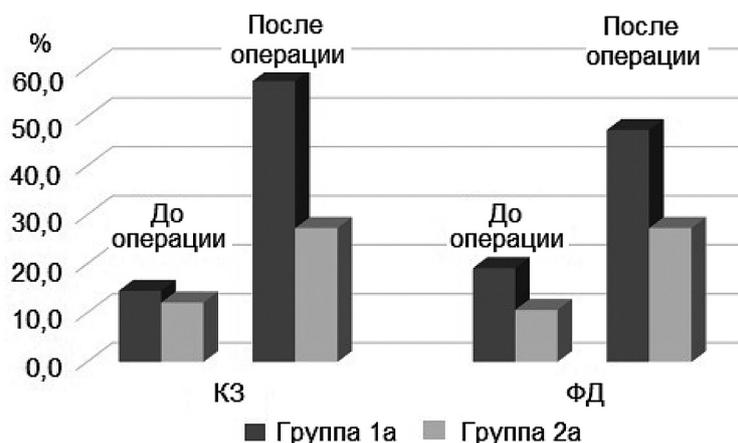


Рис. 3. Распределение пациентов в группах по наличию жалоб на качество зрения и физическому дискомфорту в области глаз до и после операции

Качество жизни пациентов, обусловленное состоянием зрения, после проведенного вмешательства статистически значимо улучшилось в обеих группах ($p < 0,001$). Если до операции в группе 1а среднее значение общего балла опросника VFQ составляло $71,1 \pm 13,0$, то после операции – $91,6 \pm 6,2$, в группе 2а – $68,5 \pm 16,6$ и $93,5 \pm 5,3$ балла соответственно. При этом ни приращение общего балла VFQ, ни полученный балл в группах не различались ни клинически, ни статистически значимо ($p = 0,243$ и $p = 0,126$ соответственно).

Жалобы на КЗ после операции отмечены в 63 (57,3 %) из 110 случаев в группе 1а и в 18 (27 %) из 66 в группе 2а ($p < 0,001$), разность составила 30 % (95 % ДИ разности 15–45 %). Наличие ФД в области глаз в группе 1а отмечено в 52 (47,3 %) из 110 случаев, в группе 2а – в 18 (27 %) из 66 случаев ($p = 0,014$), разность составила 20 % (95 % ДИ разности 5–35 %) (рис. 3). Следует отметить, что, несмотря на одинаковое количество случаев с жалобами на КЗ и ФД в группе 2а, их предъявляли разные люди.

Таким образом, лазерный *in situ* кератомилез с фемтолазерным формированием роговичного лоскута является точной, безопасной, предсказуемой и эффективной операцией. Эмметропическая либо целевая рефракция, а также острота зрения, соответствующая НКОЗ до операции, после проведения операции фемто-ЛАСИК достигается в подавляющем большинстве случаев [16]. Однако в ходе самой операции происходит индукция значительного количества АВП, в результате чего как в раннем, так и в отдаленном послеоперационном периодах наблюдается снижение не связанного с остротой КЗ [7]. Для уменьшения послеоперационных значений АВП разработан алгоритм эксимерлазерной абляции, который основан на данных измерения волнового фронта оптической системы глаза пациента. В ходе абляции происходит компенсация существующих дооперационных АВП [8]. Определить, насколько и по каким параметрам новая методика имеет преимущества при практическом применении, достаточно затруднительно, так как невозможно достичь сопоставимости групп сравнения по всем потенциально влияющим на результат показателям (в большинстве случаев пациенты сами выбирают вид абляции).

Настоящее исследование результатов операций фемто-ЛАСИК и АВП- фемто-ЛАСИК проведено в сопоставимых по всем основным показателям группах, сформированных с помощью ОПВ-анализа, что позволило объективно и корректно сравнить указанные методики по достигаемой рефракции, остроте зрения, индукции АВП, обусловленному зрением качеству жизни, а также субъективной оценке пациентами не связанного с остротой КЗ и ФД в области глаз.

Проведенное исследование подтверждает отсутствие статистически значимых различий двух видов абляции по достигаемой рефракции и остроте зрения, что было ожидаемым, поскольку операция фемто-ЛАСИК по стандартному асферическому протоколу абляции уже обеспечивает достижение высоких результатов по указанным показателям. При этом в методе фемто-ЛАСИК не предусмотрена компенсация предоперационных АВП, в то время как метод АВП-

фемто-ЛАСИК специально разработан с этой целью. Однако результаты исследования показали, что наряду с компенсацией предоперационных АВП в ходе операции происходит дополнительная индукция АВП, хотя и в достаточно небольшом количестве.

Качество жизни, обусловленное состоянием зрения, после проведенной у всех пациентов коррекции существенно выросло и составило в среднем более 90 баллов по шкале опросника NEI-VFQ-25. Это вполне предсказуемо, поскольку и после операции фемто-ЛАСИК, и после операции АВП-фемто-ЛАСИК у большого числа пациентов (73 и 83 % соответственно) достигнута некорригированная острота зрения, соответствующая или превышающая дооперационную наилучшую корригированную с помощью очков остроту зрения. В связи с этим у пациентов существенно улучшилось обусловленное зрением социальное функционирование и психическое здоровье, уменьшились или совсем исчезли связанные со зрением ролевые ограничения и зависимость от посторонней помощи (по шкалам опросника VFQ).

В то же время, несмотря на общее повышение качества жизни, обусловленного состоянием зрения, некоторые пациенты отмечали ухудшение КЗ при высокой его остроте (возникновение различных оптических феноменов вокруг источников света, значительное снижение зрения в условиях слабой освещенности и т.п.) и наличие физического дискомфорта в области глаз. После стандартной операции фемто-ЛАСИК эти явления встречались в 57,3 и 47,3 % случаев соответственно, после операции АВП-фемто-ЛАСИК – в 27 % случаев. Полученные результаты свидетельствуют о том, что персонализированная операция, учитывающая значения АВП, действительно удовлетворяет требованиям пациентов в большей степени, но в то же время не гарантирует стопроцентной удовлетворенности качеством зрения и отсутствия ФД в области глаз в послеоперационном периоде.

Заключение. Для сравнения результатов операции фемто-ЛАСИК и АВП-фемто-ЛАСИК с помощью ОПВ-анализа сформированы сопоставимые по всем исходным показателям группы. В сопоставимых группах не установлено статистически значимых различий между операциями фемто-ЛАСИК и АВП-фемто-ЛАСИК по достигаемой рефракции, послеоперационной некорригированной и наилучшей корригированной остроте зрения и степени улучшения качества жизни, связанного со зрением (опросник NEI-VFQ-25). Показано, что операция АВП-фемто-ЛАСИК дает статистически значимо лучшие результаты по послеоперационным показателям и показателям индукции суммарного значения АВП и отдельных их видов (кроме Z_{33}), а также по доле пациентов с жалобами на КЗ, не связанное с его остротой, и ФД в области глаз после операции. При этом следует отметить, что выполнение фемто-ЛАСИК по протоколу эксимерлазерной абляции, учитывающему предоперационные значения АВП, не исключает индукцию некоторого количества АВП, а соответственно, не гарантирует удовлетворенности пациентов результатами операции в 100 % случаев.

Список использованной литературы

1. Позняк, С. Н. Современные методы хирургической коррекции аномалий рефракции: учеб.-метод. пособие / С. Н. Позняк. – Минск: БГМУ, 2012. – 36 с.
2. Балашевич, Л. И. Рефракционная хирургия / Л. И. Балашевич. – СПб.: Изд. дом МАПО, 2002. – 285 с.
3. Moshirfar, M. Laser in situ keratomileusis flap complications using mechanical microkeratome versus femtosecond laser: retrospective comparison / M. Moshirfar, J. P. Gardiner // J. of Cataract & Refractive Surg. – 2010. – Vol. 36, N 11. – P. 1925–1933.
4. Durrie, D. Femtosecond laser versus mechanical keratome flaps in wavefront guided laser assisted in situ keratomileusis: prospective contralateral eye study / D. Durrie, G. Kezirian // J. of Refractive Surg. – 2005. – Vol. 31, N 1. – P. 120–126.
5. Rainbow glare as an optical side effect of IntraLASIK / R. Krueger [et al.] // Ophthalmology. – 2008. – Vol. 115, N 7. – P. 1187–1195.
6. Wavefront analysis in post-LASIK eyes and its correlation with visual symptoms, refraction and topography / M. R. Chalita [et al.] // Ophthalmology. – 2004. – Vol. 111, N 3. – P. 447–453.
7. Comparison of quality of life between myopic patients with spectacles and contact lenses, and patients who have undergone refractive surgery / N. Shams [et al.] // J. of Curr. Ophthalmol. – 2015. – Vol. 27, N 1–2. – P. 32–36.
8. Four-Year Visual, Refractive, and Contrast Sensitivity Outcomes After Wavefront-Guided Myopic LASIK Using an Advanced Excimer Laser Platform / M. S. Shaheen [et al.] // J. of Refractive Surg. – 2013. – Vol. 29, N 12. – P. 816–822.

9. *Rosenbaum, P. R.* The central role of the propensity score in observational studies for causal effects / P. R. Rosenbaum, D. B. Rubin // *Biometrika*. – 1983. – Vol. 70, N 1. – P. 41–55.
10. *Rosenbaum, P. R.* Reducing bias in observational studies using subclassification on the propensity score / P. R. Rosenbaum, D. B. Rubin // *J. Am. Stat. Assoc.* – 1984. – Vol. 79, N 387. – P. 516–524.
11. *Rosenbaum, P. R.* The bias due to incomplete matching / P. R. Rosenbaum, D. B. Rubin // *Biometrics*. – 1985. – Vol. 41, N 1. – P. 103–116.
12. *Ланг, Т. А.* Как описывать статистику в медицине: аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т. А. Ланг, М. Сесик; пер. с англ.; под ред. В. П. Леонова. – М.: Практ. медицина, 2011. – 480 с.
13. *Гланц, С.* Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
14. *Rosenbaum, P. R.* Constructing a control group using multivariate matched sampling methods that incorporate the propensity score / P. R. Rosenbaum // *Am. Stat.* – 1985. – Vol. 39, N 1. – P. 33–38.
15. *Austin, P. C.* Assessing balance in measured baseline covariates when using many-to-one matching on the propensity score / P. C. Austin // *Pharmacoepidem. Drug Saf.* – 2008. – Vol. 17, N 12. – P. 1218–1225.
16. *Shihao, C.* IntraLase Femtosecond Laser vs. Mechanical Microkeratomes in LASIK for Myopia: a Systematic Review and Meta-analysis / C. Shihao // *J. of Refractive Surg.* – 2012. – Vol. 28, N 1. – P. 15–24.

УДК 616.89-008.441.13:618.33

Е. И. БОНЬ, О. Б. ОСТРОВСКАЯ, С. М. ЗИМАТКИН

УЛЬТРАСТРУКТУРА НЕЙРОНОВ ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ МОЗГА 20-СУТОЧНЫХ КРЫСЯТ ПОСЛЕ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь, e-mail: zimatkin@grsmu.by

В работе установлены разнообразные ультраструктурные изменения в пирамидных нейронах фронтальной коры мозга крыс, свидетельствующие о структурных и гистохимических нарушениях, выявляемых на светооптическом уровне. Обнаруженные структурные преобразования пирамидных нейронов коры мозга являются основой неврологических и поведенческих нарушений у животных после антенатальной алкоголизации.

Ключевые слова: антенатальная алкоголизация, фронтальная кора мозга.

E. I. BON, O. B. OSTROVSKAYA, S. M. ZIMATKIN

ULTRASTRUCTURE FEATURES OF THE NEURONS OF THE FRONTAL CORTEX OF 20-DAY-OLD RATS AFTER ANTENATAL ALCOHOLIZATION

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus, e-mail: zimatkin@grsmu.by

The article shows the deep and diverse ultrastructural changes in the pyramidal neurons of the frontal cortex of rats that correspond to the structural and histochemical disorders revealed at the light-optical level. The revealed structural changes of the pyramidal neurons of the cerebral cortex may underlie the known irreversible neurological and behavioral disturbances in animals after antenatal alcoholization.

Keywords: antenatal alcoholization, frontal cortex.

Введение. Потребление алкоголя во время беременности сопровождается развитием ряда специфических нарушений в организме потомства, объединяемых в понятие «фетальный алкогольный синдром» (ФАС), входящий в «спектр нарушений плода, вызванных алкоголем» (fetal alcohol spectrum disorders, FASD) [1, 2]. Негативные последствия воздействия алкоголя на развивающийся мозг плода включают структурные аномалии головного мозга, неврологические, поведенческие и когнитивные дефекты. Кора головного мозга особенно чувствительна к антенатальному воздействию этанола. Последний вызывает уменьшение числа и размеров пирамидных нейронов, снижение в них содержания белка и недоразвитие цитоплазмы [3], глубокие инвагинации ядерной оболочки, распад цистерн комплекса Гольджи на вакуоли, набухание митохондрий [4], увеличение числа патологических форм нейронов [5, 6]. В проведенных ранее исследованиях потребление алкоголя крысами во время беременности сопровождалось остановкой роста, сморщиванием, а также увеличением числа гиперхромных и гипохромных пирамидных нейронов коры головного мозга у их потомства, что выявлялось при гистологическом исследовании на светооптическом уровне начиная с 20-х суток постнатального развития [7]. Вместе с тем представляло интерес выяснение особенностей ультраструктурных нарушений в этих нейронах.

Цель настоящей работы – изучение ультраструктуры внутренних пирамидных нейронов фронтальной коры головного мозга 20-суточных крыс после антенатальной алкоголизации.

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены на самках беспородных белых крыс с начальной массой 230 ± 20 г и их потомстве. Все опыты проведены с учетом «правил

проведения работ с использованием экспериментальных животных» [8]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 11.03.2014). Животные находились на стандартном рационе вивария. Крысы опытной группы на протяжении всей беременности (от дня обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках до родов) получали 15 %-ный раствор этанола в качестве единственного источника питья, а животные контрольной группы – эквивалентное количество воды. Среднее потребление алкоголя беременными самками составляло 4 ± 2 г/кг/сут. Декапитацию крысят осуществляли на 20-е сутки после рождения. Расположение фронтальной коры в гистологических препаратах головного мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [9]. Лезвием вырезали нужные участки коры и помещали их в 1 %-ный осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (рН = 7,4) на 2 ч при комнатной температуре. Далее их промывали в смеси буфера Миллонига (20 мл) и сахарозы (900 мг), обезживали в спиртах возрастающей концентрации, смеси спирта и ацетона и ацетоне, проводили через смесь смол (аралдит М + аралдит Н + дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона и заключали в эту заливочную смесь смол. Полутонкие срезы толщиной около 0,35 мкм изготавливали на ультрамикротоме MT-7000 (RMC, США), окрашивали метиленовым синим и вырезали лезвием необходимые для изучения участки внутреннего пирамидного слоя. Ультратонкие срезы толщиной около 35 нм изготавливали на том же ультрамикротоме, собирали на опорные сеточки, контрастировали ацетатом урана и цитратом свинца. Для этого сеточки со срезами опускали в каплю уранилацетата и выдерживали 20 мин в темноте при комнатной температуре, затем промывали в трех порциях бидистиллированной воды по 5 с и контрастировали цитратом свинца в течение 8 мин, промывали в трех порциях бидистиллированной воды по 5 с. Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) и фотографировали цифровой камерой Olympus MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия).

Результаты и их обсуждение. У 20-суточных крыс контрольной группы во внутреннем пирамидном слое фронтальной коры преобладают нормохромные нейроны (рис. 1, а). Для них характерно наличие светлого, богатого эухроматином клеточного ядра с расположенным в его центральной части компактным ядрышком. Небольшие глыбки гетерохроматина располагаются равномерно по всей кариоплазме, перинуклеарное пространство не расширено (рис. 1, а). В цитоплазме выявляются узкие каналцы гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) с большим количеством рибосом и умеренное количество митохондрий с хорошо выраженными кристами (рис. 1, б, в). Митохондрии имеют большие размеры и меньшее количество крист, чем у взрослых животных. Комплекс Гольджи, представленный стопками уплощенных цистерн различной протяженности, располагается в перинуклеарной зоне. В цитоплазме диффузно распределены свободные рибосомы и полисомы в умеренном количестве (рис. 1, б, в).

Нормохромные нейроны 20-суточных крысят, перенесших пренатальную алкоголизацию, обладают рядом

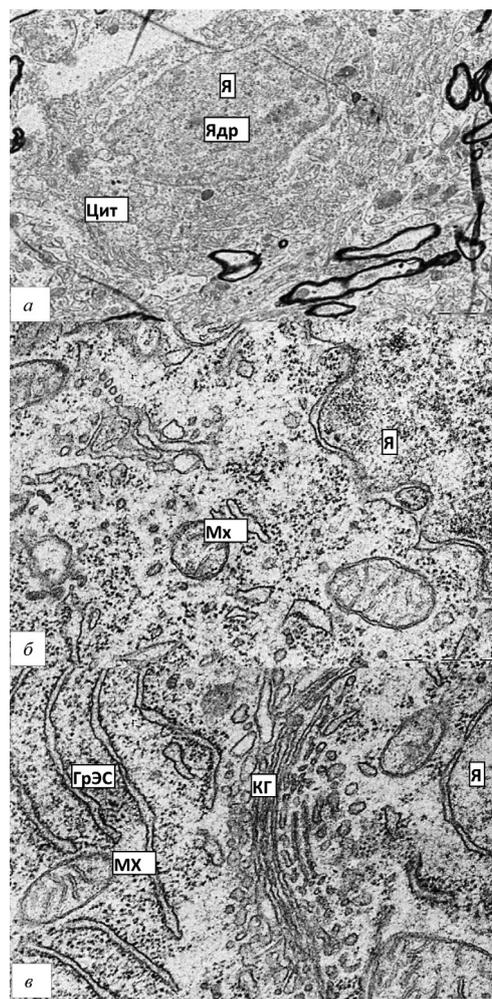


Рис. 1. Нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры контрольных 20-суточных крыс: а – общий вид нейрона ($\times 8000$); б, в – фрагменты ядра и цитоплазмы нейрона ($\times 50\,000$). Здесь и на рис. 2, 3: Я – ядро, Ядр – ядрышко, ЯО – ядерная оболочка, Цит – цитоплазма, Мх – митохондрии, СР – свободные рибосомы, КГ – комплекс Гольджи. Масштабный отрезок: а – 2 мкм; б, в – 0,5 мкм. Электроннограмма

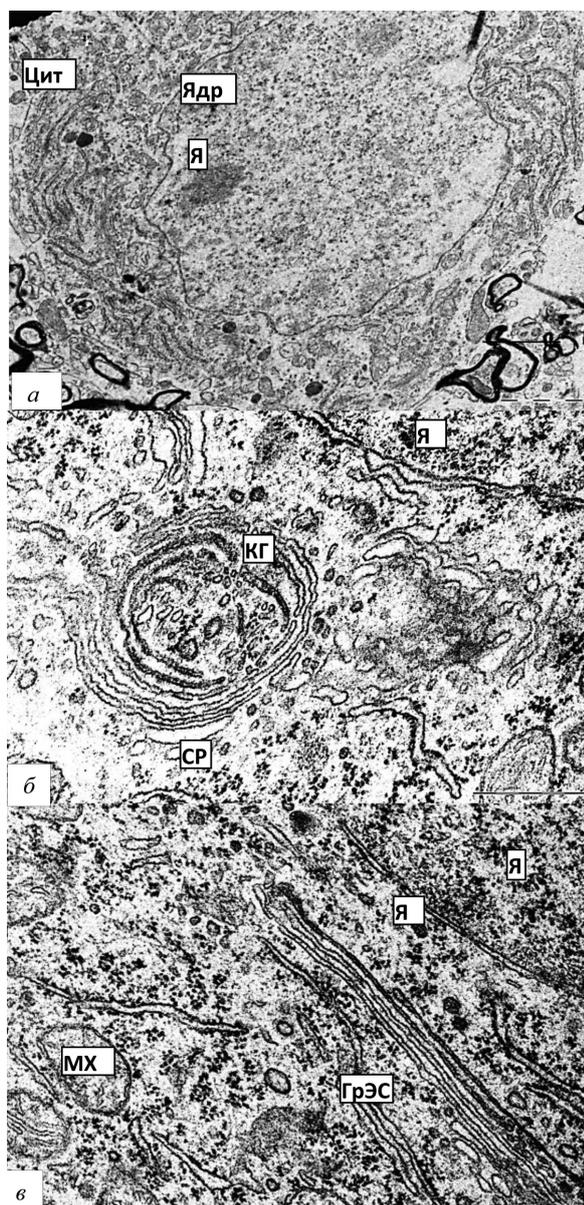


Рис. 2. Нормохромные нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры 20-суточных крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации: *а* – общий вид нейрона ($\times 8000$); *б, в* – фрагменты ядра и цитоплазмы нейрона ($\times 50\,000$)

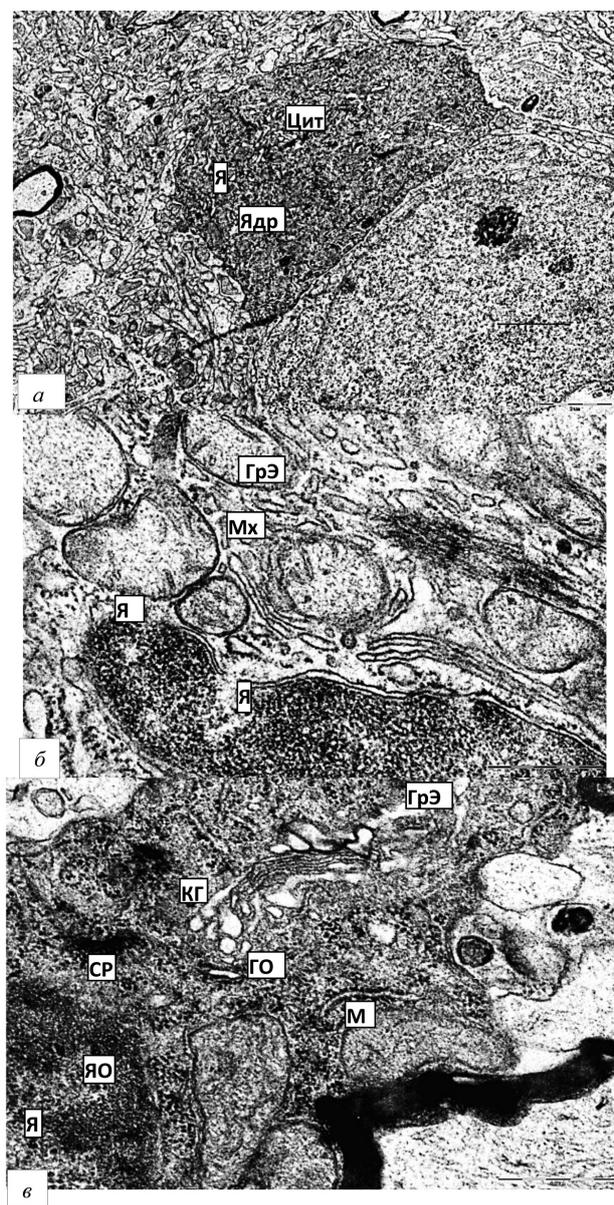


Рис. 3. Гиперхромные сморщенные нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры 20-суточных крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации: *а* – общий вид нейрона ($\times 8000$); *б, в* – фрагменты ядра и цитоплазмы нейрона ($\times 50\,000$)

отличительных черт. Так, комплекс Гольджи часто имеет кольцевидную или даже спиральную форму, цистерны ГрЭС иногда необычно сближены и почти лишены рибосом, располагаются параллельно. Увеличивается относительное количество свободных рибосом (рис. 2).

Гиперхромные сморщенные нейроны имеют темное, складчатое ядро и цитоплазму (рис. 3, *а*). В них наблюдаются дезорганизация и деструктивные изменения органелл (рис. 3, *б, в*). Канальцы ГрЭС содержат мало рибосом, цистерны комплекса Гольджи расширены, митохондрии набухшие, без крист, с осмиофильным матриксом. Преобладают свободные рибосомы, образующие обширные скопления. В цитоплазме встречаются участки с гомогенным осмиофильным содержимым (рис. 3, *б, в*). Это определяет темную окраску гиперхромных нейронов на электронограммах. Описанная ультраструктура гиперхромных нейронов аналогична той, что выявляется и в более поздние сроки постнатального развития у потомства крыс, получавших алкоголь во время беременности.

В целом нейроны животных контрольной группы имели нормальную ультраструктуру, типичную для больших пирамидных нейронов коры мозга крыс на 20-е сутки постнатального развития [10].

В наших предварительных исследованиях у антенатально алкоголизованных животных на светооптическом уровне выявлено уменьшение как общего числа нейронов, так и количества нормохромных нейронов, а также повышение количества патологических форм нейронов (гипер-, гипохромных нейронов и клеток-теней) в 5-м слое коры мозга [7]. В сохранившихся нормохромных нейронах коры антенатально алкоголизованных крыс выявлена дезорганизация цистерн комплекса Гольджи, что может свидетельствовать о наличии застойных явлений в цитоплазме [11], точнее, о нарушении аксонального транспорта веществ, синтезированных в перикарионах нейронов. Гиперхроматофилия нейронов может характеризовать преобладание синтеза белка над его расходом [4], а сморщивание с дегидратацией цитоплазмы, происходит, предположительно, в связи с нарушением водно-солевого обмена нейронов.

Набухание митохондрий и разрушение их крист в цитоплазме нейронов соответствуют полученным нами ранее гистохимическим данным об угнетении в них активности маркерных окислительных ферментов (дегидрогеназ сукцината и восстановленного НАД), что свидетельствует о снижении энергообеспечения клеток.

Уменьшение количества связанных с ГрЭС рибосом и увеличение числа свободных рибосом свидетельствует о переключении биосинтеза белка для собственных нужд нейронов, что необходимо для их выживания в неблагоприятных условиях.

Выявленные структурные изменения пирамидных нейронов коры мозга могут лежать в основе известных необратимых неврологических и поведенческих нарушений у животных после антенатальной алкоголизации [2].

Заключение. Таким образом, антенатальная алкоголизация сопровождается разнообразными ультраструктурными изменениями в пирамидных нейронах фронтальной коры мозга крыс, что позволяет объяснить механизм структурных и гистохимических нарушений, выявляемых в нервных клетках на светооптическом уровне.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект М15М-057).

Список использованной литературы

1. Riley, E. P. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview / E. P. Riley, M. A. Infante, K. R. Warren // *Neuropsychol. Rev.* – 2011. – Vol. 21. – P. 73–78.
2. Зиматкин, С. М. Алкогольный синдром плода / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь. – М.: Новое знание, 2014.
3. Артюхина, Н. И. Нарушение структурно-функциональной организации митохондрий коры головного мозга белых крыс вследствие антенатальной алкогольной интоксикации / Н. И. Артюхина, Л. В. Ноздрачева. – М., 1988. – 9 с. – Деп. в ВИНТИ 8.88, № 8475.
4. Попова, Э. Н. Ультраструктура мозга, алкоголь и потомство / Э. Н. Попова. – М.: Науч. мир, 2010.
5. Lopez-Tejero, D. Effects of prenatal ethanol exposure on physical growth sensory reflex maturation and brain development in the rat / D. Lopez-Tejero, I. Ferrer, E. Herera // *Neuropathol. and Appl. Neurobiol.* – 1986. – Vol. 3. – P. 251–260.
6. Nokelainen, P. Two brothers with macrocephaly, progressive cerebral atrophy and abnormal white matter, severe mental retardation, and Lennox-Gastaut spectrum type epilepsy: an inherited encephalopathy of childhood / P. Nokelainen, H. Heiskala, R. Raininko // *Am. J. Med. Genet.* – 2001. – Vol. 103. – P. 198–206.
7. Бонь, Е. И. Динамика гистологических изменений в париетальной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // *Новости мед.-биол. наук.* – 2015. – № 2. – С. 146–151.
8. Каркищенко, Н. Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010.
9. Paxinos, G. The Rat Brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – Australia: Academic Press, 1986.
10. Sato, I. Developmental changes in enzyme activities and in morphology of rat cortex mitochondria / I. Sato, K. Konishi, A. Mikami Okajimas Folia // *Anat. Jpn.* – 2000. – Vol. 76. – P. 353–361.
11. Ступина, А. С. Внутриядерные включения в клетках различных тканей у крыс при старении / А. С. Ступина, Т. Ю. Квитницкая-Рыжова, Н. А. Межиборская // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.* – 1987. – Т. 92, № 2. – С. 24–31.

Поступила в редакцию 22.02.2016

УДК 616.37-002:611.37

А. Ч. ШУЛЕЙКО¹, А. В. ВОРОБЕЙ¹, С. А. НОВАКОВСКАЯ², Л. И. АРЧАКОВА²

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ПЕРЕСТРОЙКА ТКАНЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ

¹*Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь, e-mail: shuleika1961@gmail.com*

²*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: novakovskaya@tut.by*

Представлены результаты изучения препаратов поджелудочной железы (ПЖ) 20 оперированных пациентов с хроническим панкреатитом (ХП) с помощью электронной микроскопии. Установлено, что при ХП в ПЖ на клеточном уровне происходит непрерывный процесс некробиоза с вовлечением всех структур железы: протоков, ацинарной ткани, нервов. Выявлено большое количество звездчатых клеток, определяющих развитие фиброза ПЖ. На основании результатов исследования установлено, что причиной прогрессирования перидуктального фиброза может быть стимуляция звездчатых клеток вторичной ишемией ткани ПЖ.

Ключевые слова: хронический панкреатит, морфологическое исследование, электронная микроскопия, звездчатые клетки.

A. Ch. SHULEIKA¹, A. V. VARABEI¹, S. A. NOVAKOVSKAYA², L. I. ARCHAKOVA²

ULTRASTRUCTURAL RESTRUCTURING THE PANCREATIC TISSUE IN CHRONIC PANCREATITIS

¹*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus, e-mail: shuleika1961@gmail.com*

²*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: novakovskaya@tut.by*

In this article we showed the results of electron microscopy of 20 pancreatic specimens from patients with chronic pancreatitis. It was established that in the pancreas in chronic pancreatitis there is a continuous cellular necrobiosis involving all structures: ductal, acinar tissue, nerves. A large number of stellate cells responsible for the development of pancreatic fibrosis are revealed. Periductal fibrosis is a cause of tissue ischemia and pancreatic stellate cells could be a reason of its progression.

Keywords: chronic pancreatitis, morphological study, electron microscopy, stellate cells.

Введение. Хронический панкреатит (ХП) является прогрессирующим воспалительным заболеванием, при котором панкреатическая секреторная паренхима разрушается и замещается фиброзной тканью, что приводит к экзо- и эндокринной недостаточности. Злоупотребление алкоголем [1–3] и курение [4] являются основными причинами развития ХП. Однако только у 10 % алкоголиков развивается ХП. Предположительно, в развитии алкогольного ХП есть дополнительные, возможно генетические, факторы (мутации гена регулятора трансмембранного муковисцидоза – CFTR) [5].

Существует несколько теорий патогенеза алкогольного хронического панкреатита. Sarles и др. [6–8] предположили, что хроническое потребление этанола повышает концентрацию белка литостатина в секрете поджелудочной железы (ПЖ) с последующим осаждением белковых пробок в протоках и кальцификацией. Образование камней, в свою очередь, приводит к обструкции протоков, атрофии ацинарной ткани, фиброзу и перидуктальному воспалению дистальнее обструкции.

Токсико-метаболическая гипотеза, выдвинутая Bordalo и Noronha [9], предполагает, что хроническое потребление алкоголя оказывает прямые токсическое и метаболические эффекты на ацинарные клетки, вызывая прогрессивное отложение липидов, атрофию ацинусов и интрапанкреатический фиброз. Описанные изменения ПЖ, в частности жировая дистрофия ацинарных

клеток, не были подтверждены другими исследователями. Согласно гипотезе окислительного стресса, последний создает в ацинарных клетках ПЖ избыточные свободные радикалы, которые вызывает блокаду клеточных ферментов и окисление мембранных липидов [10].

В последние годы ведущей является концепция последовательности некроза-фиброза [11, 12]. Эта теория постулирует, что алкогольный ХП инициируется рецидивирующим тяжелым острым панкреатитом [13]. Резорбция больших площадей жирового и геморрагического некроза, которые являются главными событиями при тяжелом панкреатите, вызывает индукцию фиброза [14, 15], в основном в междольковом пространстве [16, 17]. Междольковый фиброз, в свою очередь, влияет на структуру интерлобулярных протоков, постепенно приводя к их дилатации и стриктурам [18]. В этих измененных протоках нарушается пассаж панкреатического секрета, что может вызвать самопроизвольное выпадение белка с последующей кальцификацией. В конечном итоге нарушение функции панкреатической секреции приводит к фиброзной замене ацинарных клеток и внутридольковому фиброзу.

Патоморфологической особенностью ХП является развитие фиброза ПЖ, в основе которого лежит накопление коллагена и других протеинов внеклеточного матрикса, продуцируемых активированными панкреатическими звездчатыми клетками (ПЗК). Впервые эти клетки описаны Karl von Kupffer в 1876 г., обнаружены в 1980-х годах [19–21] и выделены в культуре в 1998 г. [22, 23]. В нормальной ПЖ они расположены в непосредственной близости от ацинарных клеток. В покое ПЗК могут рассматриваться как клетки с центральным телом и длинными цитоплазматическими выступами, простирающимися вдоль основания смежных ацинарных клеток, содержащих липидные капли в их цитоплазме с витамином А, который исчезает после их активации [26, 27]. Подсчитано, что в состоянии покоя ПЗК составляют 4–7 % от всех паренхиматозных клеток в нормальной ПЖ [22, 23]. В норме функция этих клеток заключается в поддержании нормальной анатомии ПЖ, т. е. активированные ПЗК участвуют в процессах восстановления тканей после повреждений, в том числе после панкреонекроза [3, 24, 25].

В последние годы накоплены убедительные доказательства о ключевой роли ПЗК в фиброгенезе ПЖ при ХП [22, 23, 28–31]. В ответ на повреждение ПЗК переходят из неактивного состояния в активированный фенотип миофибробластов, которые синтезируют и выделяют избыточное количество белков экстрацеллюлярного матрикса, что ведет к фиброзным изменениям ПЖ.

К потенциальным возбудителям ПЗК в естественных условиях относятся этанол и его метаболиты (ацетальдегид), активные формы кислорода; паракринные факторы, такие как цитокины (IL-1, IL-6, IL-8 и TNF- α); факторы роста: тромбоцит-производный фактор роста (PDGF) и трансформирующий фактор роста- β 1 (TGF- β 1), ангиотензин II, образованные при повреждении клеток ПЖ и лейкоцитов [32–38]. ПЗК могут самостоятельно синтезировать данные факторы роста, аутокринно поддерживая активный миофибробластный фенотип, что проявляется в прогрессировании панкреатического фиброза даже при прекращении действия панкреатит-провоцирующих факторов. Активированные ПЗК синтезируют аутокринные факторы, такие как PDGF, TGF-1, активин-А, цитокины (IL-1, IL-6 и TRAIL) и провоспалительные молекул (ЦОГ-2), эндотелин-1, что закрепляет активированный фенотип [35, 37, 39–42].

Активный фенотип ПЗК характеризуется синтезом α -гладкомышечного актина, глиального фибриллярного кислого белка, коллагена I и III типа, десмина, виментина, металлопротеиназ (MMP-1, MMP-2) тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP-1, TIMP-2), а также синтезом протеогликанов и гиалуриновой кислоты.

Развитие фиброгенеза начинается с некроза ткани и аутопереваривания, за которыми следуют воспаление и индукция фиброзной реакции [43, 44]. На начальной стадии развития острого панкреатита ПЗК находятся в тесной связи с макрофагами вокруг участков некроза, а при формировании фиброза они концентрируются в перилобарных пространствах. В период стабилизации воспалительного процесса количество ПЗК заметно уменьшается – они обнаруживаются в основном рядом с поврежденными протоками [44].

В дополнение к производству компонентов внеклеточного матрикса ПЗК обладают широким спектром клеточных функций, связанных с реализацией местного иммунитета, воспаления, ангиогенеза, а по последним данным, еще и с фагоцитарной функцией. Они могут регулировать

экзокринные функции в ПЖ через холецистокинин-индуцированное высвобождение ацетилхолина. ПЗК индуцируют апоптоз и снижают экспрессию инсулина в бета-клетках, что является новым механизмом развития диабета у пациентов с ХП [45, 46].

Механизм поддержания процесса фиброза в ПЖ, особенно после прекращения повреждающего действия, не ясен. Считается, что он зависит от гипертензии в ткани ПЖ, гипергликемии, внутриклеточной реактивной продукции активных форм кислорода, активации протеаз-активированного рецептора 2. Индукция циклооксигеназы 2, бактериальная инфекция, самоактивация ПЗК играют определенную роль в поддержании панкреатического фиброза [46].

Проведены многочисленные морфологические исследования препаратов ПЖ пациентов, страдающих ХП. Перспективным является изучение ультраструктурной патологии ПЖ при ХП с помощью электронной микроскопии [47].

Цель исследования – оценить ультраструктурные изменения ткани поджелудочной железы у пациентов с хроническим панкреатитом с помощью электронной микроскопии.

Материалы и методы исследования. Проведено изучение ультраструктурных морфологических изменений ткани ПЖ у 20 пациентов, оперированных в Минской областной клинической больнице в 2014–2015 гг. по поводу осложнений ХП. Всем пациентам выполняли резекционно-дренирующие вмешательства: Бернскую модификацию операции Бегера ($n = 18$) и операцию Фрея ($n = 2$). В 3 случаях эти вмешательства сочетали с операцией цилиндрической вирсунгэктомии. Исследовано 20 препаратов тканей головки ПЖ и 3 препарата Вирсунгова протока. Проведено сравнение полученных морфологических данных с ультраструктурой нормальной ПЖ ($n = 2$).

В работе использован электронно-микроскопический метод исследования. Препараты ткани ПЖ фиксировали в растворе, состоящем из 3 % глутарового альдегида и 1 % параформа, затем материал измельчали и обрабатывали 2 %-ным раствором четырехокси осмия. После промывания 0,1 М фосфатным буфером материал обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и заключали в аралдит по общепринятой методике (Н. Н. Боголепов, 1976). Срезы готовили на ультратоме LKB (Швеция) и просматривали в электронном микроскопе JEM-100 В (Япония).

Результаты и их обсуждение. *Электронная микроскопия поджелудочной железы (контроль).* Экзокринная часть ПЖ состоит из панкреатических ацинусов, вставочных, внутридольковых и междольковых протоков, а также главного панкреатического протока – Вирсунгова, открывающегося в двенадцатиперстную кишку. Ацинусы состоят из экзокринных панкреатоцитов, или ациноцитов, которые секретируют пищеварительные ферменты панкреатического сока (трипсин, амилазу, липазу). Ациноциты представлены клетками с широкими основаниями – гомогенными зонами, а также с суженными апикальными частями – зимогенными зонами, в которых содержатся секреторные гранулы с ферментами. В базальных частях клетки выявляется густо усеянная рибосомами гранулярная эндоплазматическая сеть, в которой осуществляется синтез ферментов. В надъядерной области клетки выявляется хорошо развитый аппарат Гольджи, а рядом – многочисленные митохондрии.

К ациноцитам сбоку примыкают мелкие клетки стенки вставочного протока, имеющие с ними общую базальную мембрану. Часть клеток протокового эпителия проникает в центр ацинуса, примыкая к апикальной части ациноцита. Это центроацинозные эпителиоциты, имеющие уплощенную форму, овальное ядро, узкий слой цитоплазмы с малочисленными органеллами. Вставочные протоки впадают в межацинозные протоки, выстланные однослойным кубическим эпителием. В цитоплазме клеток выявляется множество цистерн аппарата Гольджи и большое количество митохондрий. Межацинозные протоки впадают в более крупные внутридольковые, а те, в свою очередь, в междольковые протоки, а затем в общий проток ПЖ.

Вокруг протоков расположена рыхлая волокнистая соединительная ткань, в которой расположены кровеносные капилляры. Между ациноцитами и эпителиальными протоковыми клетками выявляются длинные цитоплазматические отростки звездчатых клеток, которые в норме накапливают липиды и витамин А.

Электронная микроскопия экзокринной ткани поджелудочной железы у пациентов с хроническим панкреатитом. Электронно-микроскопическое исследование экзокринной ча-

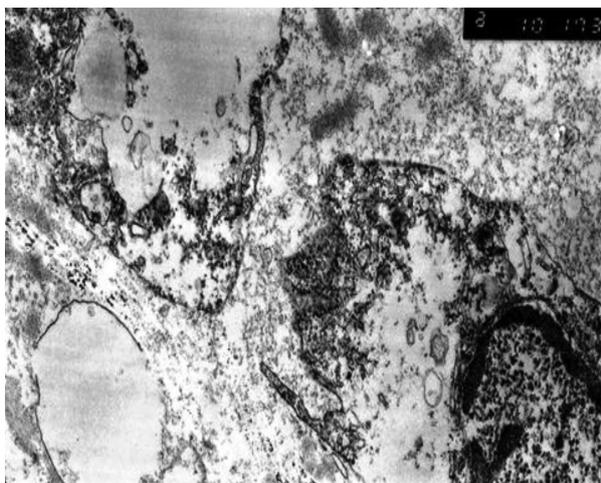


Рис. 1. Разрушение цитоплазматического матрикса ациноцитов. $\times 10\ 000$

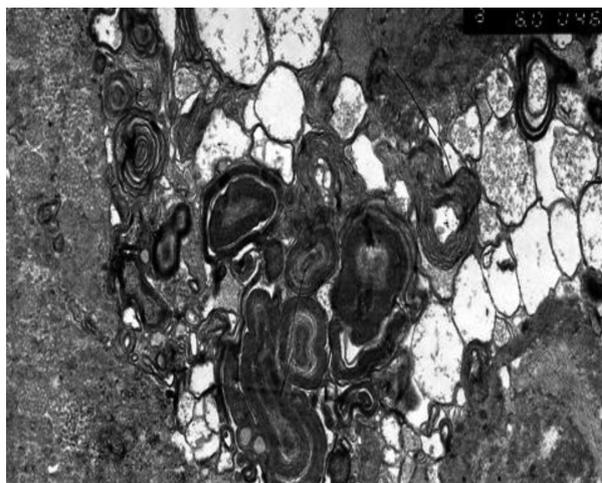


Рис. 2. Очаги деструкции и миелинизации в цитоплазме деструктивно измененных ациноцитов. $\times 6\ 000$

сти резецированных участков головки ПЖ у пациентов с хроническим панкреатитом показало картину прогрессирующего разрушения железистой ткани органа. В поле зрения панкреатических ацинусов отмечаются немногочисленные ациноциты с сохраненной структурной организацией, которые чередуются с деструктивно измененными ациноцитами. Последние характеризуются просветлением цитоплазматического матрикса, гиперплазией и разрушением цистерн гранулярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи, частичным или полным разрушением митохондрий, зимогенных гранул, появлением электронноплотных фагосом.

Большая часть панкреатических ацинусов пораженной ПЖ претерпевает необратимые изменения некробиотического характера. В ациноцитах выявляются зоны полного разрушения цитоплазматического матрикса, распада цитоплазматических органелл и зимогенных гранул (рис. 1). На месте разрушенных клеток формируются объемные вакуоли (представлены электроннопрозрачными зонами), которые ограничены мембраной и заполнены ламеллярными фрагментами.

Разрушение ацинарных клеток сопровождается образованием многочисленных внутриклеточных гигантских миелиноподобных структур, которые формируются в результате избыточного синтеза гиалина. Образование подобных структур является результатом развития в ациноцитах дистрофии и протекания извращенного синтеза гиалина под воздействием этанола. Вокруг очагов миелинизации ацинарной клетки выявляются многочисленные очаги деструкции, заполненные гипертрофированными отечными митохондриями с просветленным матриксом и электронноплотными ламеллярными структурами (рис. 2).

Деструктивные процессы в паренхиме ПЖ протекают также по типу колликвационного некроза. В некоторых ациноцитах наблюдаются многочисленные аутофагосомы, заполненные аморфным содержимым и электронноплотными включениями. В области некротического распада клеток аутофагосомы образуют объемные скопления, а вокруг них концентрируются фрагменты разрушенных органелл (рис. 3).

Наряду с вышеописанными процессами в панкреатических ацинусах наблюдается апоптоз ациноцитов. В поле зрения выявляются апоптотические тельца, состоящие из апоптотически измененных ядер, незначительного числа измененных органелл, окруженных цитоплазматической мембраной. Большая часть апоптотических телец подвергается вторичному некротическому распаду.

По мере прогрессирования заболевания активируются процессы коллагенизации паренхимы железы. В зоны деструкции ацинусов активно прорастают коллагеновые волокна, которые, окружая фрагменты ациноцитов, формируют вокруг них плотный каркас (рис. 4).

Полностью разрушенные ациноциты замещаются соединительной тканью, в результате чего формируются обширные зоны фиброза (рис. 5). Деструктивные процессы охватывают стенку

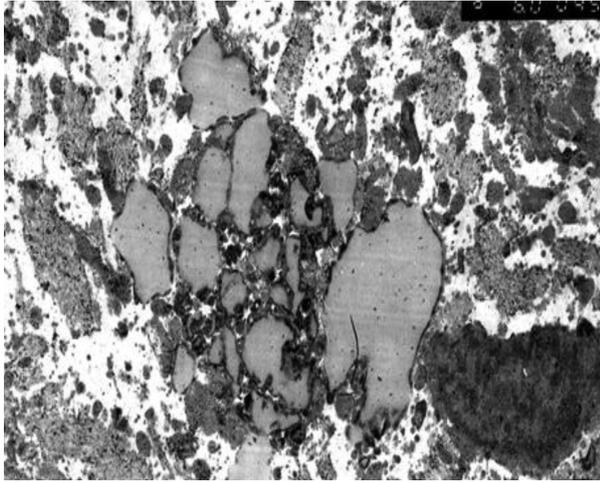


Рис. 3. Скопления аутофagosом в области некротического распада ациноцита. $\times 6\ 000$

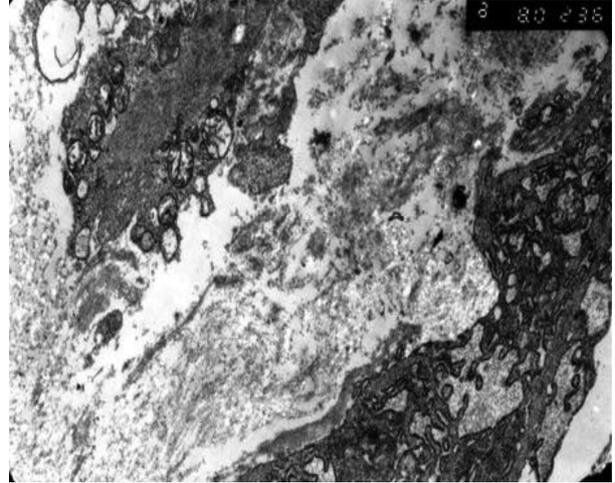


Рис. 4. Разрастания коллагеновых волокон вокруг разрушенных ациноцитов. $\times 8\ 000$

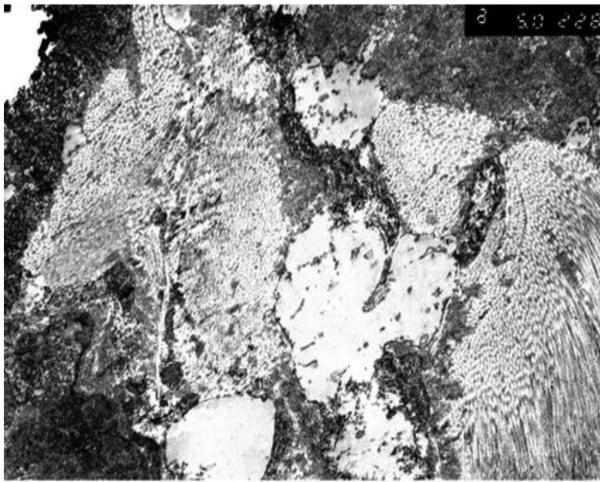


Рис. 5. Коллагенизация панкреатических ацинов поджелудочной железы и формирование обширных зон фиброза. $\times 6\ 000$

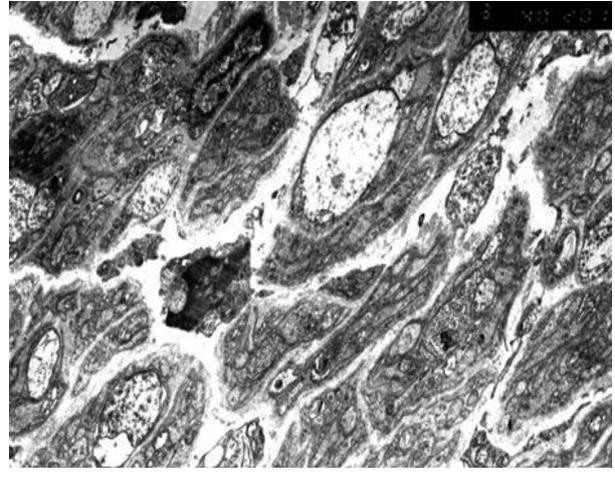


Рис. 6. Интрамуральное нервное сплетение в околопротоковом пространстве поджелудочной железы в виде гипертрофированных отечных нервных волокон, лишенных медиаторных везикул. $\times 4\ 000$

межацинозных протоков и околопротоковое пространство, состоящее из соединительной ткани и кровеносных капилляров и нервных волокон. В результате прогрессирующего фиброза перидуктальная область замещается грубой волокнистой соединительной тканью, которая, разрастаясь, суживает просвет протоков и сдавливает проходящие в ней сосуды микроциркуляторного русла ПЖ. Интрамуральные нервные сплетения представлены как неизменными пучками нервных волокон, локализованных в соединительной ткани околопротоковой области, примыкающей к сохранным ацинусам, так и гипертрофированными пучками нервных волокон с измененной структурой в зонах выраженного повреждения ПЖ (рис. 6).

В развитии прогрессирующего фиброза экзокринной части ПЖ большую роль играют звездчатые клетки, которые при повреждении органа активизируются и дифференцируются в миофибробластоподобные клетки, продуцирующие белки внеклеточного матрикса. Выявляются звездчатые клетки в зонах фиброза перидуктального пространства вставочных протоков, примыкающих к базальной мембране ациноцитов, а также среди коллагеновых волокон, разрастающихся в околопротоковой области межацинарных, междольковых и основного протоков ПЖ. Они представлены клетками продолговатой формы с длинными цитоплазматическими отростками, содержащими электронноплотные гетерохромные ядра и небольшое количество цитоплазматических органелл (рис. 7).

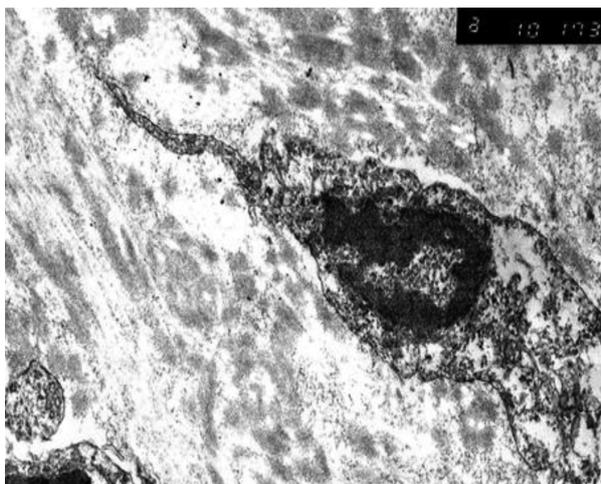


Рис. 7. Звездчатые клетки в зоне фиброза перидуктального пространства поджелудочной железы. $\times 10\ 000$

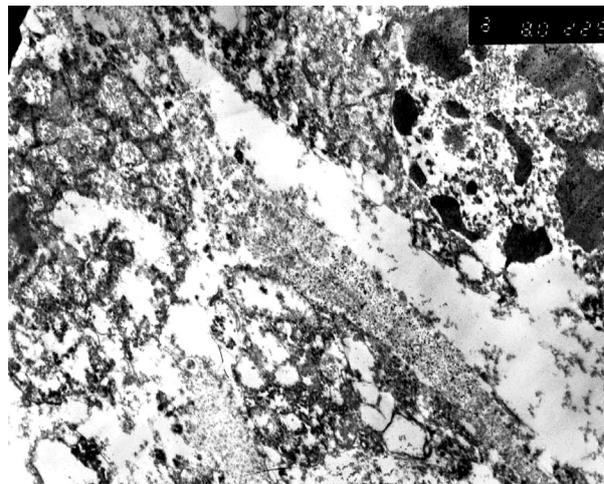


Рис. 8. Очаговая деструкция протокового эпителия поджелудочной железы. $\times 8\ 000$

Таким образом, электронно-микроскопические исследования структурных изменений в экзокринной части ПЖ при хроническом воспалении указывают на прогрессирующий характер разрушения ткани органа. Панкреатические ацинусы претерпевают необратимые изменения с последующим разрушением. Деструктивные процессы протекают по типу некробиоза, колликвационного некроза, аутофагии и апоптоза. Характерным признаком разрушения ткани железы является гиалинизация панкреатических ацинусов и формирование вокруг них обширных зон деструкции.

Описанные выше структурные преобразования в ПЖ сопровождаются прогрессирующим фиброзом органа, решающую роль в развитии которого играют звездчатые клетки. При прогрессировании заболевания они меняют свой фенотип и дифференцируются в миофибробластоподобные клетки, усиленно секретирующие белки внеклеточного матрикса, из которых формируются соединительная ткань, коллагены первого и второго типов.

Коллагенизация участков железы с разрушенными ацинусами и прилегающими перидуктальными пространствами вследствие активно протекающего фиброза приводит к полной ультраструктурной перестройке экзокринной части железы. В поле зрения выявляются склерозированные участки ткани, полностью утратившие свою функциональную активность.

Электронная микроскопия протоков. Электронно-микроскопические исследования стенки основного протока ПЖ (Вирсунгова) показали протекание в ее толще деструктивно-некротических процессов, охватывающих как единичные эпителиальные клетки, так и группы клеток с окружающей их перидуктулярной областью. Деструктивным изменениям (как правило, диффузного характера) подвергается эпителиальный слой стенки протока, в то время как патологическим изменениям – непосредственно призматический эпителий слизистой оболочки, выстилающий просвет протока, собственная соединительнотканная пластинка, а также экзокринные и эндокринные клетки, входящие в состав эпителия протока.

Эпителиальные клетки слизистой оболочки протока имеют крупные, неправильной формы ядра, окруженные перинуклеарной зоной просветления цитоплазмы, очагами лизиса, крупными вакуолями средней электронной плотности. Цитоплазматический матрикс подвержен некробиотическим изменениям, отмечается тотальное разрушение органелл и заполнение цитоплазматического пространства скоплениями ламеллярных структур и гетерогенными осмиофильными включениями (рис. 8). В цитоплазме некоторых эпителиальных клеток выявляются сливные гигантские очаги секрета, а также обширные очаги некроза цитоплазматического матрикса, окаймленные электронноплотной капсулой и содержащие клеточный детрит. Во многих клетках протокового эпителия деструктивный процесс носит распространенный характер, в результате которого большая часть цитоплазматических органелл подвергается распаду и лизису (рис. 9).

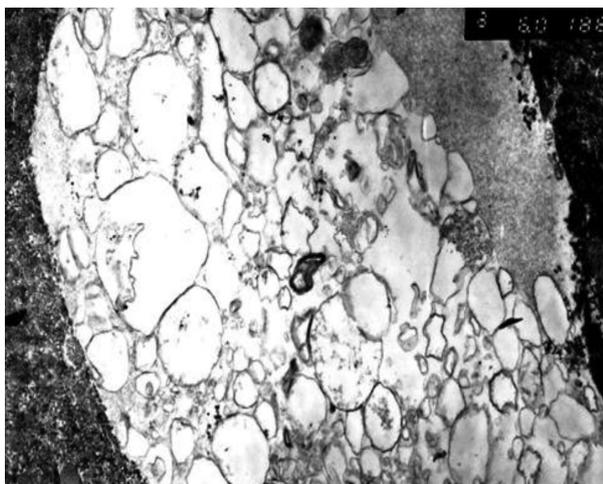


Рис. 9. Тотальная деструкция протокового эпителия поджелудочной железы. $\times 6000$

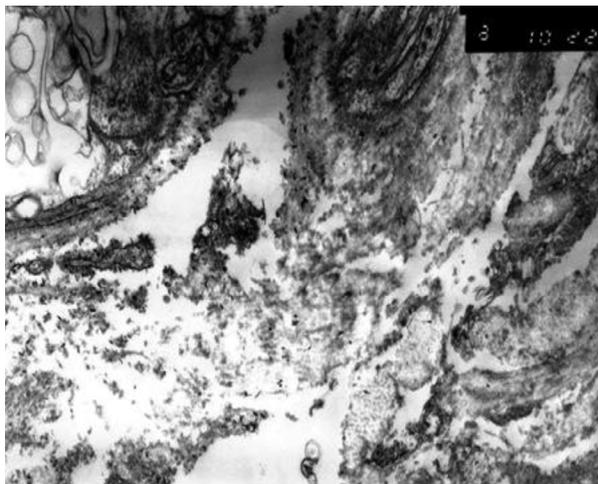


Рис. 10. Фиброз перидуктальной области поджелудочной железы. $\times 10000$

Собственная соединительнотканная пластинка слизистой оболочки протокового эпителия утолщена за счет разрастания рыхлой соединительной ткани и отека перидуктальной области. По мере прогрессирования патологического процесса отмечается разрастание коллагеновых волокон и замещение ими соединительной ткани собственной пластинки (перидуктальный фиброз).

Деструктивные изменения претерпевают эндокринные клетки эпителия слизистой оболочки, выстилающей проток. В их цитоплазме выявляются обширные зоны некроза, содержащие ламеллярные структуры разрушенных органелл и распадающиеся эндокринные секреторные гранулы различной электронной плотности. Некоторые эндокринные клетки слизистой оболочки протока утрачивают свою секреторную активность, накапливая в цитоплазме небольшое количество мелких секреторных гранул, которые по мере развития деструктивного процесса разрушаются.

Бокаловидные экзокриноциты эпителия протока сохраняют свою функциональную активность, они переполнены слизистым секретом, а после его выброса в просвет потока вновь сокращаются.

Ациноциты, прилежащие к протоковому эпителию, претерпевают деструктивные изменения, характеризующиеся вакуолизацией цитоплазмы и появлением крупных внутриклеточных очагов некроза, состоящих из электронноплотных ламеллярных структур распавшихся органелл и разрушенных секреторных гранул. При прогрессировании патологического процесса часть ациноцитов данной области подвергается тотальному разрушению.

Разрушению подвергаются центраацинозные эпителиоциты, которые формируют стенку вставочных протоков, проникающих в центр ацинусов. В клетках выявляются очаги деструкции цитоплазмы и клеточной оболочки, которые, сливаясь, формируют обширные зоны некроза.

Электронно-микроскопические исследования стенки Вирсунгового и периферических протоков ПЖ выявили прогрессирующую деструкцию клеток протокового эпителия и входящих в его состав эндокринных клеток, которые вырабатывают гормоны ПЖ (холецистокинин и панкреозимин) и стимулируют секреторную активность ациноцитов. Наблюдается чередование участков протокового эпителия с очаговыми разрушениями с полностью разрушенными участками слизистой протоков. На месте распавшихся эпителиальных клеток выявляются ламеллярные фрагменты органелл и электронноплотные включения.

Активируются процессы коллагенизации перидуктального пространства, в результате которых вокруг деструктивно измененного эпителия протоков отмечаются обширные разрастания соединительной ткани. Разрушенный протоковый эпителий полностью замещается соединительной тканью, которая, по мере прогрессирования заболевания, уплотняется, коллагенизируется, приобретает признаки рубцовой ткани, характерные для фиброза (рис. 10).

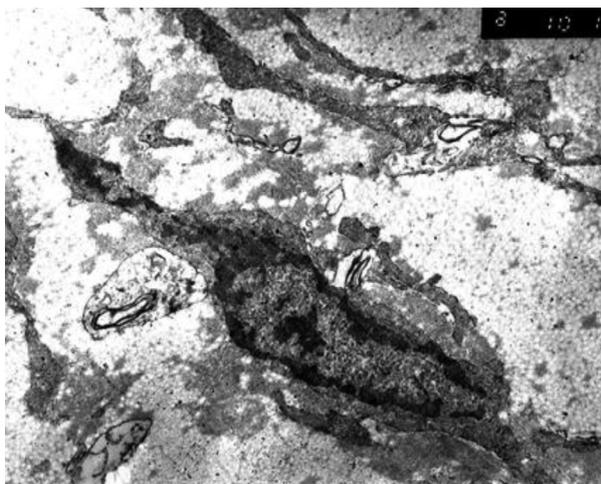


Рис. 11. Звездчатые клетки в области перидуктального фиброза поджелудочной железы. $\times 10\ 000$

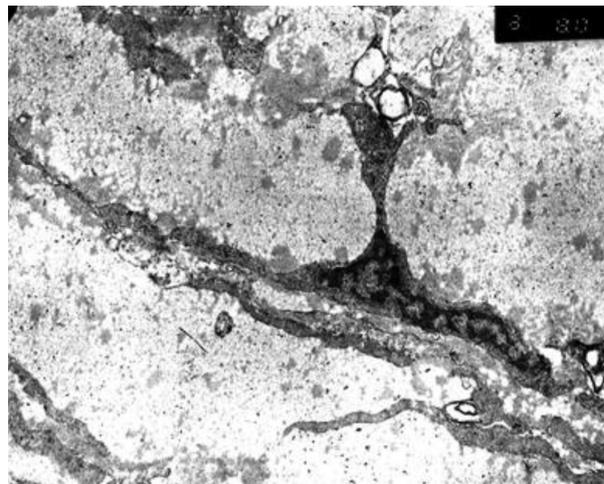


Рис. 12. Звездчатые клетки в очагах тотального фиброза поджелудочной железы. $\times 8\ 000$

Решающую роль в развитии перидуктального фиброза играют звездчатые клетки ПЖ, которые при прогрессировании патологического процесса дифференцируются в миофибробластоподобные клетки. Последние синтезируют большое количество белков внеклеточного матрикса, формирующих соединительную ткань, глиальный фибриллярный белок, коллагены I, III, IV типов, десмин, металлопротеиназы, протеогликаны.

В сохранившихся вставочных протоках звездчатые клетки выявляются у апикальной поверхности ациноцитов, имеют крупное ядро и узкий ободок цитоплазмы с длинными цитоплазматическими отростками. Вокруг них отмечаются разрастания коллагеновых волокон, которые суживают просвет протоков, нарушая их проходимость.

В зонах тотального разрушения протокового эпителия ПЖ выявляется большое количество звездчатых клеток, в которых отмечается прогрессирующий фиброз перидуктального пространства (рис. 11).

Активность звездчатых клеток ПЖ увеличивается на поздних стадиях заболевания, когда фиброз ПЖ принимает распространенный характер, а в поле зрения отмечаются объемные участки протокового эпителия, перидуктального пространства и прилежащей к ним экзокринной части железы, полностью замещенные соединительной тканью. В центре описанных участков выявляются скопления фибробластоподобных звездчатых клеток с уплощенными ядрами и длинными цитоплазматическими отростками (рис. 12).

Фиброз протокового эпителия и окружающего его пространства сопровождается формированием электронноплотных скоплений как в стенке, так и в просвете протоков. Данные образования следует рассматривать как очаги гиалинизации, из которых в дальнейшем формируются конкременты, закупоривающие просвет протоков.

Деструктивные изменения претерпевает интрамуральный нервный аппарат ПЖ, расположенный в соединительной ткани перидуктального пространства. Нервные волокна выявляются в виде гипертрофированных образований с поврежденной структурой, частично или полностью лишенных медиаторных везикул и заполненных электроннопрозрачной аксоплазмой, содержащей редуцированные нейрофиламенты. Отдельные нервные волокна тотально разрушены. Согласно ультраструктурным характеристикам, подобные нервные волокна находятся в состоянии деградации.

Заключение. В ПЖ при ХП на клеточном уровне происходит непрерывный процесс некробиоза с вовлечением всех структур железы: протоков, ацинарной ткани, нервов.

Деструктивные процессы в ацинарной ткани ПЖ протекают по типу некробиоза, колликвационного некроза, аутофагоцитоза и апоптоза.

Звездчатые клетки ПЖ являются причиной развития фиброза и образования белковой стромы для конкрементов через очаги миелинизации. Деструктивные процессы охватывают стенку межацинарных протоков и околопротоковое пространство, состоящее из соединительной ткани

и проходящих в ней кровеносных капилляров и нервных волокон. В результате прогрессирующего фиброза перидуктальная область замещается грубой волокнистой соединительной тканью, которая, разрастаясь, суживает просвет протоков и сдавливает проходящие в ней сосуды микроциркуляторного русла ПЖ. Развивающаяся вторичная ишемия ткани ПЖ через стимуляцию звездчатых клеток может быть причиной непрерывного прогрессирования фиброза в ПЖ.

Таким образом, просвет периферических протоков суживается вплоть до стриктур, а в просвете формируются конкременты. Создаются условия для развития периферической протоковой гипертензии, что является дополнительным патогенетическим фактором стойкой абдоминалгии при ХП. Усиливают периферическую протоковую гипертензию процессы фиброза в эпителии протоков всех уровней. На основании проведенного исследования установлено, что протоковая гипертензия формируется за счет трех компонентов: фиброза самой стенки протоков, сдавления протоков извне перидуктальным фиброзом, формирования конкрементов в просвете протоков.

Для ликвидации периферической протоковой гипертензии, которая через механизмы гипоксии ПЖ является основным фактором поддержания процесса фиброза после прекращения действия повреждающих факторов, нами обоснован новый вид хирургического вмешательства – «цилиндрическая вирсунгэктомия» [48].

Нервные элементы ПЖ находятся в различной степени деградации, вплоть до распада, и носят вторичный характер, связанный с основной патологией.

Разрушение ацинарных клеток сопровождается образованием многочисленных внутриклеточных гигантских миелиноподобных структур, которые формируются в результате избыточного синтеза гиалина. Образование подобных структур является результатом развития в ациноцитах дистрофии и протекания извращенного синтеза гиалина под воздействием этанола. Гигантские миелиноподобные структуры могут быть матрицей для последующего формирования конкрементов в протоках ПЖ.

Список использованной литературы

1. *Worning, H.* Incidence and prevalence of chronic pancreatitis / H. Worning // *Chronic Pancreatitis* / eds: H. G. Beger, M. Büchler, H. Ditschuneit, P. Malfertheiner. – Berlin: Heidelberg Springer, 1990. – P. 8–14.
2. *Mössner, J.* Epidemiology of chronic pancreatitis / H. Worning // *Standards in Pancreatic Surgery* / eds: H. G. Beger, M. Büchler, P. Malfertheiner. – Berlin: Springer, 1993. – P. 263–271.
3. *Apte, M.* The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells / M. Apte, R. Pirola, J. Wilson // *Antioxid Redox. Signal.* – 2011. – Vol. 15. – P. 2711–2722.
4. *Lankisch, P. G.* Pancreatitis / P. G. Lankisch, P. A. Banks. – Berlin: Springer, 1998. – P. 22–35.
5. *Dreiling, D. A.* The natural history of alcoholic pancreatitis / D. A. Dreiling, M. Koller // *Mt. Sinai J. Med.* – 1985. – Vol. 52. – P. 340–342.
6. *Chronic pancreatitis, relapsing pancreatitis, calcification of the pancreas* / H. Sarles [et al.] // *Gastroenterology* / ed.: H. L. Bockus. – 2nd ed. – Philadelphia: WB Saunders, 1976. – P. 1040–1051.
7. *Pancreatic stone protein II: implication in stone formation during the course of chronic calcifying pancreatitis* / I. Multigner [et al.] // *Gastroenterology.* – 1985. – Vol. 89. – P. 387–391.
8. *Sarles, H.* Pathogenesis of chronic pancreatitis / H. Sarles, J. P. Bernard, L. Gullo // *Gut.* – 1990. – Vol. 31. – P. 629–632.
9. *Noronha, M.* Alcohol and the pancreas. II. Pancreatic morphology of advanced alcoholic pancreatitis / M. Noronha, O. Bordalo, D. A. Dreiling // *Am. J. Gastroenterol.* – 1981. – Vol. 76. – P. 120–124.
10. *Braganza, J. M.* Pancreatic disease: a casualty of hepatic "detoxification"? / J. M. Braganza // *Lancet.* – 1983. – Vol. 29. – P. 1000–1003.
11. *Klöppel, G.* Pathology of acute and chronic pancreatitis / G. Klöppel, B. Maillet // *Pancreas.* – 1993. – Vol. 8. – P. 659–670.
12. *Comfort, M. W.* Chronic relapsing pancreatitis. A study of twenty-nine cases without associated disease of the biliary or gastro-intestinal tract / M. W. Comfort, E. E. Gambill, A. H. Baggenstoss // *Gastroenterology.* – 1946. – Vol. 6. – P. 239–285, 376–408.
13. *Ammann, R. W.* Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study / R. W. Ammann, P. U. Heitz, G. Klöppel // *Gastroenterology.* – 1996. – Vol. 111. – P. 224–231.
14. *Chronic pancreatitis is associated with increased concentrations of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor, and phospholipase C gamma* / M. Korc [et al.] // *Gut.* – 1994. – Vol. 35. – P. 1468–1473.
15. *Localizing of transforming growth factor β -1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis* / J. L. van Laethem [et al.] // *Gastroenterology.* – 1995. – Vol. 108. – P. 1873–1881.
16. *Klöppel, G.* Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern / G. Klöppel, S. Detlefsen, B. Feyerabend // *Virchows Arch.* – 2004. – Vol. 445. – P. 1–8.

17. Klöppel, G. The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis / G. Klöppel, B. Maillet // *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* – 1992. – Vol. 420. – P. 1–4.
18. Klöppel, G. Chronic pancreatitis of alcoholic and nonalcoholic origin / G. Klöppel // *Semin. Diagn. Pathol.* – 2004. – Vol. 21. – P. 227–236.
19. Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver / S. L. Friedman // *Physiol. Rev.* – 2008. – Vol. 88. – P. 125–172.
20. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases / M. B. Omary [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 50–59.
21. Watari, N. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration / N. Watari, Y. Hotta, Y. Mabuchi // *Okajimas Folia Anat. Jpn.* – 1982. – Vol. 58. – P. 837–858.
22. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture / M. V. Apte [et al.] // *Gut.* – 1998. – Vol. 43. – P. 128–133.
23. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans / M. G. Bachem [et al.] // *Gastroenterology.* – 1998. – Vol. 115. – P. 421–432.
24. Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans / A. Zimmermann [et al.] // *Gut.* – 2002. – Vol. 51. – P. 574–578.
25. Pancreas recovery following cerulein-induced pancreatitis is impaired in plasminogen-deficient mice // A. Lugea [et al.] // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 131. – P. 885–899.
26. Jaster, R. Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro: biological and molecular effects of all-transretinoic acid / R. Jaster, I. Hilgendorf, B. Fitzner // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 66. – P. 633–641.
27. Talukdar, R. Pancreatic stellate cells: new target in the treatment of chronic pancreatitis / R. Talukdar, R. K. Tandon // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2008. – Vol. 23. – P. 34–41.
28. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells / M. G. Bachem [et al.] // *Gastroenterology.* – 2005. – Vol. 128. – P. 907–921.
29. Klöppel, G. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern / G. Klöppel, S. Detlefsen, B. Feyerabend // *Virchows Arch.* – 2004. – Vol. 445. – P. 1–8.
30. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover / P. A. Phillips [et al.] // *Gut.* – 2003. – Vol. 52. – P. 275–282.
31. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells / A. Vonlaufen [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – P. 2085–2093.
32. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis / M. V. Apte [et al.] // *Gut.* – 1999. – Vol. 44. – P. 534–541.
33. Luttenberger, T. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis / T. A. Luttenberger, Schmid-Kotsas, A. Menke // *Lab. Invest.* – 2000. – Vol. 80. – P. 47–55.
34. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells / E. Schneider [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P. 532–543.
35. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis / F. W. Shek [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 160. – P. 1787–1798.
36. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis / P. Mews [et al.] // *Gut.* – 2002. – Vol. 50. – P. 535–541.
37. Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology / P. A. Phillips [et al.] // *Gut.* – 2003. – Vol. 52. – P. 677–682.
38. Angiotensin II promotes the proliferation of activated pancreatic stellate cells by Smad7 induction through a protein kinase C pathway // K. Hama [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 340. – P. 742–750.
39. Gao, R. Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha5beta1 as a novel CCN2 receptor / R. Gao, D. R. Brigstock // *Gastroenterology.* – 2005. – Vol. 129. – P. 1019–1030.
40. Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to pro-inflammatory cytokines / H. Aoki [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 292. – P. 259–268.
41. Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis / N. Ohnishi [et al.] // *Gut.* – 2003. – Vol. 52. – P. 1487–1493.
42. Endothelin-1 stimulates contraction and migration of rat pancreatic stellate cells / A. Masamune [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 6144–6151.
43. Ammann, R. W. Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study / R. W. Ammann, P. U. Heitz, G. Klöppel // *Gastroenterology.* – 1996. – Vol. 111. – P. 224–231.
44. Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis: the role of tissue necrosis, macrophages, myofibroblasts and cytokines / S. Detlefsen [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2006. – Vol. 19. – P. 1019–1026.
45. Masamune, A. Pancreatic stellate cells – multi-functional cells in the pancreas / A. Masamune, T. Shimosegawa // *Pancreatol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 102–105.
46. Shimizu, K. Mechanisms of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis / K. Shimizu // *J. Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 43. – P. 823–832.
47. Боголенов, Н. Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга / Н. Н. Боголенов. – М., 1976. – 71 с.
48. Выбор метода хирургического лечения хронического панкреатита / А. В. Воробей [и др.] // *Вестн. хирургии.* – 2014. – Т. 173. – С. 36–43.

Поступила в редакцию 11.07.2017

УДК 616.155.392.8-036.11:577.21]-037-053.2

Ю. А. БАРОВСКАЯ, М. В. СТЕГАНЦЕВА, А. М. КУСТАНОВИЧ,
Т. В. САВИЦКАЯ, О. В. АЛЕЙНИКОВА

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ НА ПРОГНОЗ ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
Минск, Беларусь, e-mail: julia@tut.by

Целью данного исследования являлся анализ прогностического значения молекулярно-генетических изменений при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) у детей, получавших лечение в Республике Беларусь по оригинальным протоколам ОМЛ-ММ-2000 и ОМЛ-ММ-2006. Наличие *inv(16)* и *t(8; 21)* при ОМЛ ассоциировано с благоприятным исходом. Показатели выживаемости пациентов с *t(1; 11)* сравнимы с таковыми в группе *CBF*, что также позволяет отнести данную аномалию к прогностически благоприятной. Риск развития рецидива у пациентов с *t(10; 11)* выше, чем у остальной когорты *11q23*. Прогностическое влияние на исход болезни у лиц с нормальным кариотипом оказывает наличие либо отсутствие дополнительных генетических событий.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, дети, молекулярно-генетические изменения, прогноз.

Yu. A. BAROUSKAYA, M. V. STEGANTSEVA, A. M. KUSTANOVICH, T. V. SAVITSKAYA, O. V. ALEINIKOVA

EFFECT OF MOLECULAR GENETIC CHANGES ON THE PROGNOSIS IN CASE OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN CHILDREN

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus, e-mail: julia@tut.by

The main goal of this research is to analyze the prognostic significance of molecular genetic changes in case of AML (acute myeloid leukemia) in children treated in the Republic of Belarus under original AML-MM-2000 and AML-MM-2006 protocols. The presence of *inv(16)* and *t(8; 21)* in AML is related to a favorable outcome. The survival index among patients with *t(1; 11)* is comparable to the *CBF* group, which also allows us to qualify such abnormality as with the favorable prognosis. The risk of relapse among patients with *t(10; 11)* is higher than among the rest of *11q23* cohort. The presence or the absence of any additional genetic events has a prognostic impact on the clinical outcome for patients with normal karyotype.

Keywords: acute myeloid leukemia, children, molecular genetic changes, prognosis.

Введение. На долю острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) приходится 15–20 % от всех острых лейкозов детского возраста [1]. За последние 40 лет достигнут значительный прогресс в лечении детского ОМЛ: показатель выживаемости пациентов младше 20 лет увеличился от 20 % в 1970 г. до 31 % в 1980 г., 42 % в 1990 г. и 55 % для пациентов, диагноз которым установлен в период с 2002 по 2008 г. [2]. Это стало возможным благодаря интенсификации химиотерапии, более точной стратификации пациентов по группам риска, проведению трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в селектированных группах пациентов, улучшению сопроводительной терапии, оценке статуса ремиссии с помощью показателя минимальной остаточной болезни (МОБ).

На сегодняшний день наиболее важными факторами прогноза при ОМЛ являются молекулярно-генетические изменения в бластных клетках. Согласно современной модели лейкогенеза, в каждом конкретном случае развитие заболевания может быть вызвано как минимум двумя генетическими абберациями. Первая группа (класс I) включает гены, мутации в которых вызывают активацию определенных путей сигнальной трансдукции, что приводит к повышенной пролиферации лейкозных клеток. К этой группе относятся мутации, ведущие к активации тирозинкиназных рецепторов *FLT3* или *KIT*, а также мутации генов семейств *RAS*, *JAK2* и др. Вторая группа (класс II) включает мутации и/или хромосомные изменения, которые воздействуют

на активность и специфичность факторов транскрипции или компонентов комплекса активации транскрипции и модулирования хроматина. Такие мутации приводят к возникновению блока дифференцировки кроветворных клеток-предшественников. Результатом мутаций II класса являются химерные гены, возникающие при хромосомных транслокациях $t(8; 21)$, $inv(16)$, $t(16; 16)$ (в совокупности именуемые *CBF*-лейкозом) и $t(15; 17)$, а также при многочисленных хромосомных аберрациях, затрагивающих локус 11q23. В эту же группу входят мутации в генах *CEBPA* (*C/EBP α* , семейство ССААТ/enhancer binding protein) и, возможно, мутации гена нуклеофосмина *NPM1* [3–5].

Наиболее часто у детей обнаруживаются следующие цитогенетические аберрации (класс II): $t(8; 21)(q22; q22)$, $inv(16)(p13.1q22)$, $t(15; 17)(q22; q21)$ и аномалии 11q23 [6, 7]. Данные аберрации охватывают более 50 % случаев детского ОМЛ. У 20–25 % детей с ОМЛ определяется нормальный кариотип (НК) [8]. Однако ряд пациентов с НК имеют дополнительные мутации (в генах *NPM1*, *CEBPA* и др.), которые не выявляются при стандартном кариотипировании и обнаружение которых требует дополнительных методов молекулярной диагностики. Мутация *NPM1* встречается при детском ОМЛ не более чем в 10 % случаев. Еще реже обнаруживается мутация гена *CEBPA* (в 4,5–6 % случаев) [2, 9–13].

Развитие ОМЛ осложняют также эпигенетические нарушения. Мутации таких генов, как *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL*, *TET2* и др., редко обнаруживаются при детском ОМЛ (общая частота встречаемости во всей когорте составляет от 1 до 10 %, в группе пациентов с НК – 20 %) [2, 14].

Сочетание мутаций I и II класса не случайно. Так, например, мутации генов семейства *RAS* часто обнаруживаются у пациентов с 11q23 аномалиями, мутация *c-kit* характерна для *CBF*-лейкоза, *FLT3-ITD* – для лиц с $t(15; 17)(q22; q21)$ и др. [15].

Ряд генетических аномалий имеет доказанное прогностическое значение. Критерием благоприятного прогноза является наличие $inv(16)/t(16; 16)$, $t(15; 17)(q22; q21)$ или $t(8; 21)(q22; q22)$. К прогностически неблагоприятным аберрациям относят моносомию 7 и мутацию гена *FLT3* [2, 10, 16–19]. Наличие активирующей мутации *c-kit* оказывает негативное влияние на прогноз у взрослых пациентов с поломками гена *CBF* [20, 21]. По данным литературы, такое сочетание генетических аномалий при детском ОМЛ не является прогностически значимым [22]. Мутация гена *NPM1* у пациентов с НК и «диким» типом *FLT3* обуславливает благоприятный прогноз [2]. Наличие биаллельной мутации *CEBPA* является независимым фактором благоприятного исхода при детском ОМЛ [23–25].

Наиболее гетерогенной является группа 11q23 аномалий. Прогноз заболевания зависит от партнера *MLL*-гена. Результаты лечения пациентов с $t(9; 11)$ лучше, чем при других аберрациях 11q23, однако это подтверждается не всеми исследовательскими группами [6]. Наличие $t(6; 11)$, $t(10; 11)$ ассоциировано с неблагоприятным исходом, в то время как наличие $t(1; 11)$ прогностически более благоприятно [2, 15, 16, 19].

На сегодняшний день активно изучается значение множества мутаций в генах эпигенетической регуляции у взрослых пациентов с ОМЛ. Прогностическое значение мутаций таких генов, как *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL*, *TET2* и др., при детском ОМЛ не доказано [26, 27].

В табл. 1 представлены молекулярно-генетические критерии стратификации пациентов детского возраста с ОМЛ на прогностические группы согласно международным рекомендациям группы ВФМ (Берлин-Франкфурт-Мюнстер-группа) [28].

Т а б л и ц а 1. Молекулярно-генетические критерии стратификации пациентов с ОМЛ

Прогноз	Цитогенетика
Благоприятный	$t(8; 21)(q22; q22)/RUNX1-RUNX1T1$
	$inv(16)(p13.1q22)/t(16; 16)(p13.1; q22)/CBFB/MYH11$
	$t(15; 17)(q22; q21)/PML-RARA$
	НК с мутацией <i>NPM1</i>
	НК с биаллельной мутацией <i>CEBPA</i>
	$t(1; 11)(q21; q23)/MLL-MLLT11$ <i>GATA1s</i>

Прогноз	Цитогенетика
Промежуточный	Цитогенетические аномалии, не относящиеся к благоприятному и неблагоприятному критериям
Неблагоприятный	-7, -5 или del(5q)
	inv(3)(q21q26.2) или t(3; 3)(q21; q26.2)/ <i>RPNI-MECOM(EVII-MDS1-EAP)</i>
	t(6; 9)(p23; q34)/ <i>DEK-NUP214</i>
	t(7; 12)(q36; p13)/ <i>ETV6(TEL)-HLXB9(MNX1)</i>
	t(4; 11)(q21; q23)/ <i>MLL-MLLT2</i>
	t(6; 11)(q27; q23)/ <i>MLL-MLLT4</i>
	t(5; 11)(q35; p15.5)/ <i>NUP98-NSD1</i>
	t(10; 11)(p12; q23)/ <i>MLL-MLLT10</i>
	Комплексный кариотип (3 и более)
	<i>FLT3-ITD</i>
t(9; 22)(q34; q11.2)	

Цель исследования – анализ прогностического значения молекулярно-генетических изменений при остром миелоидном лейкозе у детей, получавших лечение в Республике Беларусь по оригинальным протоколам ОМЛ-ММ-2000 и ОМЛ-ММ-2006.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены пациенты ($n = 151$) в возрасте от 0,02 до 25,8 года (медиана возраста – 10,75 года) с *de novo* ОМЛ, получившие программное лечение в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии г. Минска в период с мая 1999 г. по декабрь 2013 г. по оригинальным протоколам ОМЛ-ММ-2000 ($n = 81$) и ОМЛ-ММ-2006 ($n = 70$). Пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом, вторичным лейкозом и предшествующим миелодиспластическим синдромом, а также детей с синдромом Дауна исключали из исследования. Результаты лечения пациентов определены на 01.05.2015 г. Медиана наблюдения составила 2,64 года, для пациентов в ремиссии – 9,25 года.

Диагноз ОМЛ устанавливали на основании морфоцитохимического и иммунофенотипического исследований бластных клеток и классифицировали согласно критериям Франко-Американско-Британской (FAB) группы. Цитогенетический анализ проводили общепринятым методом краткосрочного культивирования клеток костного мозга с последующей дифференциальной G-окраской метафазных хромосом, а также методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Для выявления химерных онкогенов использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией [29]. Для выявления мутаций в генах *CEBPA* и *NPM1* проведен прескрининг методом SSCP (single strand conformational polymorphism). Результаты подтверждены методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Для определения мутации гена *FLT3-ITD* использовали метод ПЦР с последующим фрагментным анализом.

Протокол ОМЛ-ММ-2000. Согласно данному протоколу, проводилась стратификация пациентов на две прогностические группы: благоприятного и неблагоприятного прогноза. Критериями благоприятной прогностической группы являлись *inv(16)* и *t(8; 21)*, все остальные пациенты относились к неблагоприятной прогностической группе. Для пациентов с благоприятным прогнозом предполагалось проведение 5 курсов полихимиотерапии (ПХТ), в то время как для детей с неблагоприятным прогнозом планировалось проведение 4 блоков ПХТ и аллогенной ТГСК при наличии родственного донора либо аутологичной ТГСК при его отсутствии.

Протокол ОМЛ-ММ-2006. Согласно данному протоколу, проводилась уточненная стратификация пациентов на три прогностические группы: благоприятную, промежуточную и неблагоприятную. К благоприятной прогностической группе относили пациентов с *inv(16)*; *t(8; 21)* с дополнительной потерей половой хромосомы ($-Y/X$) и без мутации *c-kit*. Критериями неблагоприятной прогностической группы являлись: НК с внутренней tandemной дупликацией юкстамедулярного домена гена *FLT3* (*FLT3-ITD*) и без мутации гена *NPM1*; 11q23 аномалии; *inv3*, *t(3; 3)*; *t(8; 21)* с *c-kit*; моносомия 7-й, 5-й хромосом; сложные аномалии (более 3); M7, M6 по FAB класси-

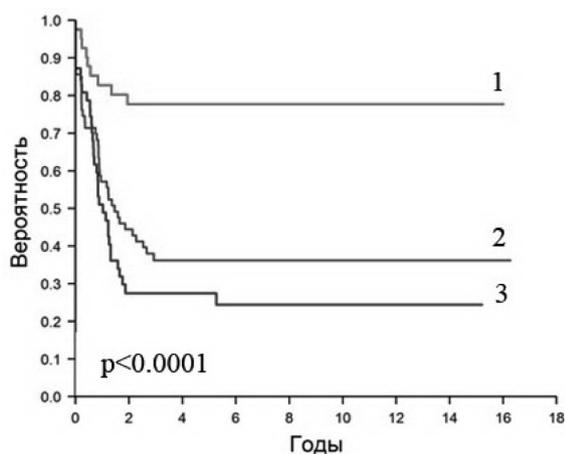


Рис. 1. Бессобытийная выживаемость пациентов с ОМЛ в зависимости от прогностической группы: 1 – благоприятный прогноз ($n = 41$, 32 в полной продолжительной ремиссии (ППР) [$78 \pm 7\%$]); 2 – промежуточный прогноз ($n = 63$, 23 в ППР [$36 \pm 6\%$]); 3 – неблагоприятный прогноз ($n = 47$, 16 в ППР [$24 \pm 6\%$])

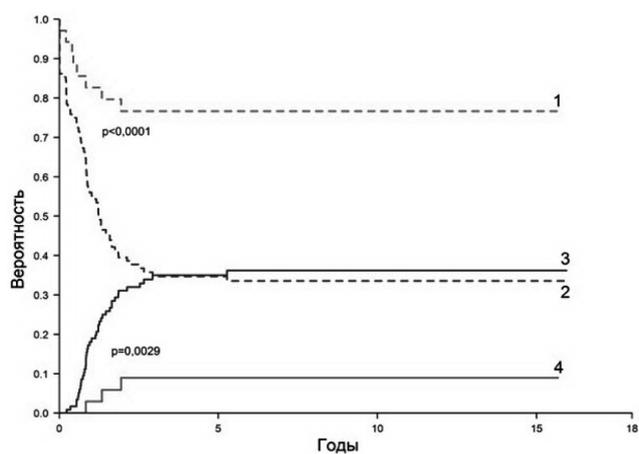


Рис. 2. Бессобытийная выживаемость и кумулятивная частота рецидива у пациентов в зависимости от наличия благоприятных поломок (CBF): 1 – EFS CBF ($n = 35$, 24 в ППР [$77 \pm 7\%$]); 2 – EFS другие ($n = 116$, 40 в ППР [$34 \pm 4\%$]); 3 – CIR другие ($n = 116$, 41 рецидив [$36,2 \pm 4,6\%$]); 4 – CIR CBF ($n = 35$, 3 рецидива [$9,0 \pm 5,0\%$])

фикации. Все остальные пациенты входили в промежуточную группу прогноза. Терапевтический план для пациентов благоприятной прогностической группы не претерпел изменений в сравнении с окончательной версией протокола ОМЛ-ММ-2000. Пациентам промежуточной прогностической группы при наличии совместимого родственного донора проводилась аллогенная ТГСК, при отсутствии родственного донора – ПХТ. Пациентам группы неблагоприятного прогноза было показано проведение аллогенной ТГСК от родственного или неродственного донора.

Учитывая различия в стратификации пациентов на прогностические группы по двум протоколам, в данном исследовании для всей когорты пациентов ($n = 151$) нами применены молекулярно-генетические критерии, рекомендованные группой BFM (табл. 1).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы R-statistics 3.2.0. Для оценки выживаемости пациентов применяли метод Каплана–Майера. Различия в выживаемости в группах оценивали с помощью log-rank теста [30]. Для расчета кумулятивных частот применяли метод конкурирующих рисков [31]. Различия кумулятивных частот в группах оценивали с помощью теста Грэя [32]. Сравнение в группах по индивидуальным параметрам проводили с помощью теста хи-квадрат (χ^2). Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Распределение пациентов по прогностическим группам риска было следующим: группа благоприятного прогноза – 41 (27,2 %) пациент, промежуточного – 63 (41,7 %), неблагоприятного – 47 (31,1 %). Таким образом, наиболее часто у пациентов отмечались молекулярно-генетические критерии промежуточного прогноза.

Вероятность 16-летней бессобытийной выживаемости (EFS) для пациентов благоприятной, промежуточной и неблагоприятной прогностических групп составила 78 ± 7 , 36 ± 6 и $24 \pm 6\%$ соответственно (рис. 1).

Нами установлено, что у лиц с CBF-лейкозом статистически значимо лучшие результаты лечения, чем у остальной когорты пациентов: показатель EFS для лиц с CBF-лейкозом составил $77 \pm 7\%$ по сравнению с показателем $34 \pm 4\%$ у остальной когорты пациентов ($p = 0,0001$). При этом кумулятивная частота рецидива (CIR) также оказалась статистически значимо ниже у пациентов с CBF-лейкозом по сравнению с остальной когортой ($9,0 \pm 5,0$ и $36,2 \pm 4,6\%$ соответственно, $p = 0,0029$) (рис. 2).

Анализ результатов лечения пациентов с t(8; 21) в зависимости от протокола представлен в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Результаты лечения пациентов с t(8; 21) в зависимости от протокола

Показатель	ОМЛ-ММ-2000 (n = 17)	ОМЛ-ММ-2006 (n = 10)	p
Смерть в индукции	0 (0 %)	0 (0 %)	
Без ответа на терапию	0 (0 %)	0 (0 %)	
Смерть в ремиссии	2 (11,8 %)	2 (20 %)	0,5607
Рецидив	3 (17,6 %)	0 (0 %)	0,1588
Потеря из-под наблюдения	1 (5,9 %)	1 (10 %)	0,6931
Полная продолжительная ремиссия	11 (64,7 %)	7 (70 %)	0,7781

Статистически значимых различий в результатах терапии пациентов с t(8; 21) в зависимости от протокола не выявлено. Тем не менее, основной причиной неудач в лечении данной когорты пациентов по протоколу ОМЛ-ММ-2000 были рецидивы заболевания, которые развились в 17,6 % случаев. Путем выбора оптимального режима проведения курсов ПХТ, увеличения суммарной дозы цитарабина и антрациклинов удалось добиться отсутствия рецидивов при проведении последующего протокола ОМЛ-ММ-2006 [33].

Среди пациентов с inv(16), получавших лечение по двум протоколам, случаев резистентности заболевания, смертей в ремиссии, а также рецидивов не зарегистрировано (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Результаты лечения пациентов с inv(16) в зависимости от протокола

Показатель	ОМЛ-ММ-2000 (n = 4)	ОМЛ-ММ-2006 (n = 4)
Смерть в индукции	0 (0 %)	1 (25 %)
Потеря из-под наблюдения	1 (25 %)	0 (0 %)
Полная продолжительная ремиссия	3 (75 %)	3 (75 %)

В группе детей с *CBF*-лейкозом, получавших лечение по двум протоколам, существенных различий в результатах терапии между пациентами с inv(16) и t(8; 21) не получено. Однако в группе пациентов с inv(16) (n = 8) в ППР находилось 75 % детей, тогда как в группе пациентов с t(8; 21) (n = 27) – 66,7 %. Таким образом, результаты терапии пациентов с inv(16) лучше в сравнении с результатами терапии лиц с t(8;21), что согласуется с данными литературы.

Учитывая генетическую неоднородность группы с t(8; 21), нами проанализированы результаты лечения пациентов данной когорты в зависимости от дополнительных аномалий (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Результаты лечения пациентов с t(8; 21) в зависимости от дополнительных поломок

Показатель	t(8; 21), единственная аберрация (n = 5)	t(8; 21), -Y/X (n = 10)	t(8; 21), -Y; c-kit (n = 1)	t(8; 21), -Y; FLT3-ITD (n = 1)	t(8; 21), -Y; del(9) (n = 1)	t(8; 21), del(9) (n = 3)	t(8; 21), др. аберрации (n = 6)
Рецидив	1 (20 %)	1 (10 %)	0	0	0	1 (33,3 %)	0
Смерть в ремиссии	1 (20 %)	1 (10 %)	0	0	0	0	2 (33,3 %)
Потеря из-под наблюдения	0	0	0	0	0	0	2 (33,3 %)
Полная продолжительная ремиссия	3 (60 %)	8 (80 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	2 (66,7 %)	2 (33,3 %)

Статистически значимых различий в результатах терапии пациентов с t(8;21) в зависимости от наличия дополнительных поломок в исследуемой когорте не выявлено, однако данные требуют уточнения на большей выборке пациентов.

Нами проанализировано влияние на исход различных перестроек 11q23 (*MLL*-гена). Несмотря на то что t(1; 11)(q21; q23) выявлена только у двух пациентов за исследуемый временной период, оба они находились в ППР без проведения ТГСК. На втором месте по результатам лечения с показателем EFS 56 ± 12 % оказались пациенты, у которых выявлена t(9; 11)(p22; q23). При обнаружении t(10; 11)(p12; q23) и одного из вариантов ее инсерции ins(10; 11)(p12; q23q21) вероят-

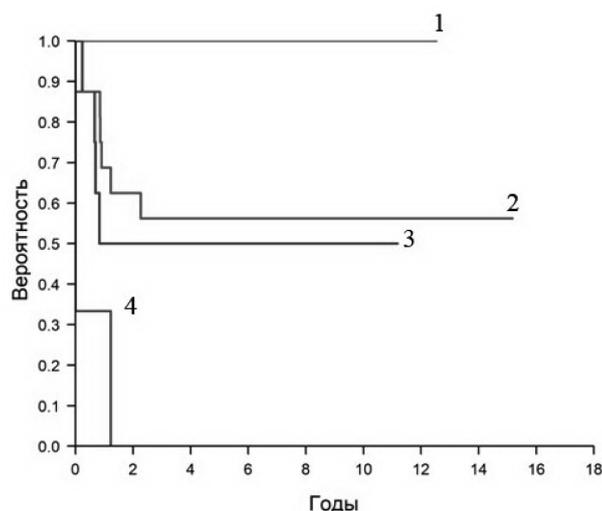


Рис. 3. Бессобытийная выживаемость пациентов с 11q23 в зависимости от транслокации: 1 – t(1; 11) ($n = 2$, 2 в ППР [100 %]); 2 – t(9; 11) ($n = 16$, 9 в ППР [56 ± 12 %]); 3 – t(10; 11) ($n = 8$, 4 в ППР [50 ± 17 %]); 4 – t(6; 11) ($n = 3$, 0 в ППР [0])

ность долгосрочной EFS составила 50 ± 17 %. Крайне неудовлетворительными в нашем исследовании были результаты лечения пациентов с t(6; 11)(q27; q23) (рис. 3).

Однако при анализе частоты возникновения рецидивов на первом месте оказались пациенты с t(10; 11) (рецидив развился в 50 % случаев), на втором месте – пациенты с t(6; 11) (33,3 %), что подтверждает неблагоприятное влияние данных аномалий (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. Результаты лечения пациентов с 11q23 аномалиями в зависимости от транслокации

Показатель	t(9; 11) ($n = 16$)	t(1; 11) ($n = 2$)	t(6; 11) ($n = 3$)	t(10; 11) ($n = 8$)
Смерть в индукции	2 (12,5 %)	0	2 (66,7 %)	0
Смерть в ремиссии	2 (12,5 %)	0	0	0
Рецидив	3 (19 %)	0	0	4 (50 %)
Полная продолжительная ремиссия	9 (56 %)	2 (100 %)	1 (33,3 %)	4 (50 %)

Учитывая, что при лечении по протоколу ОМЛ-ММ-2006 для пациентов с t(9; 11) была введена ПХТ с использованием кладрибина, нами проанализированы результаты лечения данной когорты в зависимости от протокола (табл. 6).

Т а б л и ц а 6. Результаты лечения пациентов с t(9; 11) в зависимости от протокола

Показатель	ОМЛ-ММ-2000 ($n = 5$)	ОМЛ-ММ-2006 ($n = 10$)
Смерть в индукции	0 (0 %)	2 (20 %)
Смерть в ремиссии	0 (0 %)	2 (20 %)
Рецидив	2 (40 %)	1 (10 %)
Полная продолжительная ремиссия	3 (60 %)	5 (50 %)

Статистически значимых различий в результатах терапии пациентов с t(9; 11) в зависимости от протокола не получено. Тем не менее, следует отметить, что при лечении по протоколу ОМЛ-ММ-2006 4 пациента из 10 погибли в период индукции и консолидации ремиссии. В то же время при лечении по протоколу ОМЛ-ММ-2006 удалось снизить количество рецидивов у данной когорты пациентов с 40 до 10 %.

Наибольшие затруднения в прогнозировании выживаемости и риска развития рецидива заболевания представляет группа пациентов с НК. Проанализировано прогностическое влияние выявленных нами мутаций у пациентов данной когорты. Как видно из рис. 4, негативное влияние на прогноз оказывает мутация *FLT3* (кумулятивная частота рецидива составила 100 %),

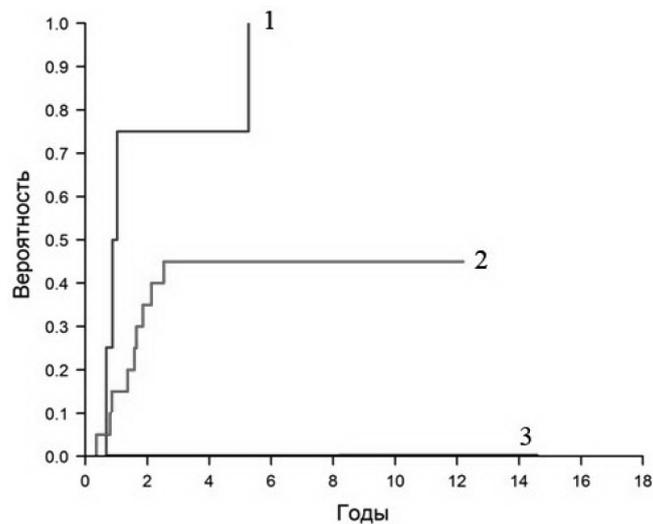


Рис. 4. Кумулятивная частота развития рецидива у пациентов с НК в зависимости от наличия/отсутствия дополнительных мутаций: 1 – НК + *FLT3* ($n = 4$, 4 рецидива [100 %]); 2 – НК ($n = 20$, 9 рецидивов [45 ± 12 %]); 3 – НК + *CEBPA* и НК + *NPM1* ($n = 4$, 0 рецидивов [0 %])

в то время как в группе пациентов с наличием мутаций генов *CEBPA* и *NPM1* рецидивов не зарегистрировано. В силу малой выборки пациентов в данном исследовании пациенты с мутациями *CEBPA* и *NPM1* объединены нами в одну группу, без учета мутационного статуса гена *CEBPA*. В группе пациентов с НК, где доступными методами нами не обнаружено дополнительных генетических событий, кумулятивная частота развития рецидива составила 45 ± 12 %.

Заключение. Большинство пациентов с ОМЛ имеют молекулярно-генетические критерии промежуточного прогноза.

Наличие *inv(16)* и *t(8; 21)* при ОМЛ ассоциировано с благоприятным исходом. В исследуемой когорте пациентов с *CBF*-лейкозом не обнаружено прогностического влияния дополнительных поломок на исход заболевания.

Показатели выживаемости пациентов с *t(1; 11)* сравнимы с таковыми в группе *CBF*, что также позволяет отнести данную аномалию к прогностически благоприятной. Риск развития рецидива у пациентов с *t(10;11)* выше, чем у остальной когорты *11q23*. Показатели выживаемости у лиц с *t(9; 11)* выше 50 %, однако для улучшения результатов терапии необходимо снизить показатель смертности в ремиссии.

Прогностическое влияние на исход болезни пациентов с НК оказывает наличие либо отсутствие дополнительных генетических событий. Наличие мутаций *CEBPA* либо *NPM1* обуславливает хороший прогноз, тогда как обнаружение мутации *FLT3* – неблагоприятный прогностический фактор.

Для улучшения стратификации данной когорты пациентов с ОМЛ требуется выявление дополнительных генетических факторов прогноза.

Список использованной литературы

1. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management / J. D. de Rooij [et al.] // J. Clin. Med. – 2015. – Vol. 4, N 1. – P. 127–149.
2. Rubnitz, J. E. Childhood Acute Myeloid Leukaemia / J. E. Rubnitz, H. Inaba // Br. J. of Haematol. – 2012. – Vol. 159, N 3. – P. 259–276.
3. Гук, Л. Г. Анализ мутаций в генах *FLT3*, *KIT*, *MLL*, *NPM1* у детей с острым миелоидным лейкозом: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.21 / Фед. науч.-клин. центр детск. гематол., онколог. и иммунол. – М., 2010. – 28 с.
4. Gilliland, D. G. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy / D. J. Gilliland // Semin. Hematol. – 2002. – Vol. 39, N 4. – P. 6–11.
5. Takahashi, S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia / S. Takahashi // J. of Hematol. and Oncol. – 2011. – Vol. 4, N 36. – P. 1–11.

6. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Med. Res. Council Treatment Trials AML 10 and 12 / C. J. Harrison [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2674–2681.
7. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98 / C. von Neuhoff [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2682–2689.
8. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia / B. V. Balgobind [et al.] // *Haematologica.* – 2011. – Vol. 96. – P. 1478–1487.
9. Faulk, K. Overview of therapy and strategies for optimizing outcomes in de novo pediatric acute myeloid leukemia / K. Faulk, L. Gore, T. Cooper // *Pediatric Drugs.* – 2014. – Vol. 16, N 3. – P. 213–227.
10. Rubnitz, J. E. How I treat pediatric acute myeloid leukemia / J. E. Rubnitz // *Blood.* – 2012. – Vol. 119, N 25. – P. 5980–5988.
11. Characterization of CEBPA mutations and promoterhypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia / I. H. Hol-link [et al.] // *Haematologica.* – 2011. – Vol. 96. – P. 384–392.
12. Marcucci, G. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications / G. Marcucci, T. Haferlach, H. Döhner // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29, N 5. – P. 475–486.
13. Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group / P. A. Ho [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 113, N 26. – P. 6558–6566.
14. Mapping epigenetic regulator gene mutations in cytogenetically normal pediatric acute myeloid leukemia / D. G. Valerio [et al.] // *Haematologica.* – 2014. – Vol. 99, N 8. – P. 130–132.
15. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia / B. Balgobind [et al.] // *Haematologica.* – 2011. – Vol. 96, N 10. – P. 1478–1487.
16. Pui, C.-H. Biology, risk stratification and therapy of pediatric acute leukemias: an update / C.-H. Pui, W. Carroll, S. Meshinchi // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29, N 5. – P. 551–565.
17. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel / U. Creutzig [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, N 16. – P. 3187–3205.
18. Rassi, F. Update on optimal management of acute myeloid leukemia / F. Rassi, M. Arellano // *Clin. Med. Insights: Oncology.* – 2013. – Vol. 7. – P. 181–197.
19. Paschka, P. Core-binding factor acute myeloid leukemia: can we improve on HiDAC consolidation? / P. Paschka, K. Dohner // *Hematology.* – 2013. – Vol. 2013, N 1. – P. 209–219.
20. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Ital. retrospective study / R. Cairoli [et al.] // *Blood.* – 2006. – Vol. 107, N 9. – P. 3463–3468.
21. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML) / N. Boissel [et al.] // *Leukemia.* – 2006. – Vol. 20, N 6. – P. 965–970.
22. Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML / J. A. Pollard [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 115, N 12. – P. 2372–2379.
23. Characterization of CEBPA mutations and promoterhypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia / I. H. Hol-link [et al.] // *Haematologica.* – 2011. – Vol. 96, N 3. – P. 384–392.
24. Marcucci, G. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications / G. Marcucci, T. Haferlach, H. Döhner // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29, N 5. – P. 475–486.
25. Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group / P. A. Ho [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 113, N 26. – P. 6558–6566.
26. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia / Y. Shen [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 118, N 20. – P. 5593–5603.
27. Cooperating gene mutations in childhood acute myeloid leukemia with special reference on mutations of ASXL1, TET2, IDH1, IDH2, and DNMT3 / D.-C. Liang [et al.] // *Blood.* – 2013. – Vol. 121, N 15. – P. 2988–2995.
28. Creutzig, U. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel / U. Creutzig, M. M. van den Heuvel-Eibrink, B. Gibson // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, N 16. – P. 3187–3205.
29. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia / J. van Dongen [et al.] // *Leukemia.* – 1999. – Vol. 13, N 12. – P. 1901–1928.
30. Kaplan, E. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations / E. Kaplan, P. Meier // *J. of the Am. Stat. Association.* – 1958. – Vol. 53, N 282. – P. 457–481.
31. Gooley, T. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators / T. Gooley, W. Leisenring, J. Crowley // *Statistics in Medicine.* – 1999. – Vol. 18, N 6. – P. 695–706.
32. Gray, R. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk / R. Gray // *The Annals of Statistics.* – 1988. – Vol. 16, N 3. – P. 1140–1154.
33. Clinical and genetic characteristics of acute myeloid leukemia with t(8; 21) in children and results of therapy according to protocol AML-MM-2000 / I. Kalinina [et al.] // *Onkologematologiya.* – 2011. – Vol. 6, N 1. – P. 11–18.

Поступила в редакцию 21.06.2016

УДК 616.441-006.6-085.357:616.15

Т. А. ЛЕОНОВА¹, Ж. А. БЕЗЛЕР², Т. А. МИТЮКОВА³, С. Б. КОХАН³, Е. Б. ЛУЗИНА³,
А. М. ПИСАРЕНКО¹, В. А. КОНДРАТОВИЧ¹

СЕРДЕЧНЫЙ РИТМ У ПАЦИЕНТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ СУПРЕССИВНЫМИ ДОЗАМИ ЛЕВОТИРОКСИНА

¹Минский городской онкодиспансер, Минск, Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

³Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: mityukovat@gmail.com

Проведено обследование прооперированных по поводу карциномы щитовидной железы пациентов, получающих супрессивную терапию левотироксином более 10 лет, с целью выявления ранних признаков развития болезней системы кровообращения. Оценены показатели variability сердечного ритма с учетом контроля уровня кальция в крови и индекса массы тела. Показано, что важнейшим параметром, влияющим на состояние сердечно-сосудистой системы, является уровень кальция в крови, поэтому его нормализация является первостепенной задачей. Охарактеризованы потенциально неблагоприятные сдвиги variability сердечного ритма у лиц с нормальной и избыточной массой тела. Рекомендована схема проведения медицинского осмотра с учетом минимально необходимого спектра показателей для выявления групп риска по развитию болезней системы кровообращения.

Ключевые слова: супрессивная терапия левотироксином, variability сердечного ритма, избыточная масса тела, гипокальциемия, болезни системы кровообращения.

T. A. LEONOVA¹, Zh. A. BEZLER², T. A. MITYUKOVA³, S. B. KOHAN³, E. B. LUZINA³,
A. M. PISARENKO¹, V. A. KONDRATOVICH¹

HEART RATE OF PATIENTS TREATED WITH SUPPRESSIVE LEVOTHYROXINE DOSES

¹Minsk City Clinical Oncologic Dispensary, Minsk, Belarus

²Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

³Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: mityukovat@gmail.com

Patients operated for thyroid cancer and receiving suppressive therapy with levothyroxine for more than 10 years were examined. The goal is to identify the early signs of the cardiovascular disease. Heart rate variability taking into account the level of calcium in the blood and body mass index was estimated. The most important parameter affecting the cardiovascular system was the level of calcium in the blood; therefore, its normalization was the primary task. Potential unfavorable changes of heart rate variability were described in patients with normal and overweight. The scheme of a medical examination with the minimum required parameters was recommended to identify high-risk groups for the development of cardiovascular diseases.

Keywords: suppressive levothyroxine therapy, heart rate variability, overweight, cardiovascular diseases, hypocalcemia.

Введение. Супрессивная терапия левотироксином для подавления роста тиреоидной карциномы начала широко применяться уже в первой половине прошлого века и в настоящее время является общепринятым компонентом комплексного лечения высококодифференцированного рака щитовидной железы (ВДРЦЖ) [1–5]. Термином «высокодифференцированный рак щитовидной железы» обозначают гистологические типы папиллярных и фолликулярных карцином, которые являются преобладающими формами (до 95 %) всех злокачественных новообразований щитовидной железы (ЩЖ) [1–5]. Лечение ВДРЦЖ предусматривает хирургическое удаление опухоли, радиоiodтерапию и супрессивную терапию левотироксином. Прооперированные пациенты должны пожизненно либо длительное время (до полной ремиссии) принимать левотироксин (L-T4) с целью подавления (супрессии) уровня тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ) в сыворотке крови [1–5]. Супрессивная тироксинотерапия при ВДРЦЖ основана на эксперименталь-

ных и клинических данных, показывающих, что ТТГ стимулирует пролиферацию тиреоидных клеток, поглощение радиоiodа и продукцию тиреоглобулина (ТГ) фолликулярными клетками ЩЖ [6, 7]. На сегодняшний день все международные протоколы лечения ВДРЩЖ, в том числе в России и Беларуси, диктуют максимальное подавление продукции ТТГ ($<0,1$ мЕ/л) при исходно высоком риске рецидивов основного заболевания в течение первых 2–5 лет послеоперационного периода [1, 2, 8]. При низком и очень низком риске рекомендуются уровни ТТГ в пределах от 0,1 до 0,5 мЕ/л [1, 8]. При длительном (более 10 лет) безрецидивном течении злокачественного заболевания проводится пересмотр целевых значений ТТГ с учетом побочных эффектов супрессивной терапии левотироксином, важнейшими из которых являются нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы (ССС) [1–3, 8, 9].

Показано, что у пациентов молодого и среднего возраста, длительно получающих супрессивную терапию L-T4, выявляются признаки риска сердечно-сосудистых заболеваний (повышение частоты пульса и артериального давления (АД), диастолическая дисфункция, увеличение массы левого желудочка) [9–11]. Эти изменения могут носить донозологический характер, тем не менее они имеют клиническое значение как факторы сердечно-сосудистого риска и предикторы будущих заболеваний ССС, а также повышенного риска смертности от сердечно-сосудистой патологии [12, 13]. У пациентов в возрасте 60 лет и старше более высокий риск развития побочных эффектов, чем у пациентов среднего и молодого возраста. Проспективные исследования в течение 13 лет показали, что у пожилых людей при эндогенном или экзогенном субклиническом гипертиреозе риск фибрилляции предсердий выше в 10 раз, чем у эутиреоидных субъектов [14, 15]. Высокий риск нарушений сердечного ритма у пожилых субъектов ассоциирован с супрессией ТТГ менее 0,4 мЕ/л [14–16]. Ряд исследований демонстрирует, что частота развития фибрилляции предсердий практически одинакова у лиц с манифестным и субклиническим гипертиреозом, что указывает на необходимость оценки состояния ССС и, в частности, сердечного ритма у таких пациентов [16]. К сожалению, не все среднестатистические сдвиги у пациентов с ВДРЩЖ, описанные в литературе [3, 9] (например, такие как увеличение массы миокарда левого желудочка по данным ЭхоКГ), могут служить диагностическими критериями, поскольку их индивидуальные значения чаще всего остаются в пределах нормы. На сегодняшний день вопрос разработки простых и доступных критериев для выделения групп риска по развитию болезней системы кровообращения (БСК) среди молодых пациентов, длительно получающих супрессивную терапию L-T4, остается актуальным.

Цель работы – исследовать электрофизиологические характеристики миокарда, включая вариабельность сердечного ритма, у молодых пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы, более 10 лет получающих супрессивную терапию L-T4, выделить группы риска по развитию болезней системы кровообращения и разработать перечень необходимых показателей, оцениваемых при проведении медицинского осмотра.

Материалы и методы исследования. Процедура обследования включала информированное согласие на проведение медицинского осмотра, осмотр врачом-эндокринологом, антропометрическое обследование с оценкой массы тела (кг), роста (см), окружности талии (ОТ, см). Измерения частоты сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин) и АД (мм рт. ст.) проводили с использованием автоматического прибора Microlife (Швейцария). Из числа обследованных исключали лиц с ранее установленными БСК и другими видами сопутствующей патологии.

Методом рандомизации в целевую группу отобрано 93 человека (73 женщины, 20 мужчин) из общего количества обследованных с достигнутым уровнем супрессии ТТГ $< 0,5$ мЕ/л. Возрастной интервал – 20–45 лет, средний возраст – $31,0 \pm 0,5$ года. Пациенты получали супрессивную терапию L-T4 в средней дозе 2,66 мкг/кг массы тела в течение $15,9 \pm 0,8$ года. Лица с индексом массы тела (ИМТ = масса тела, кг/рост в m^2) в пределах нормы ($18–25$ кг/ m^2) составляли 71 %, с избыточной массой тела (ИМТ $25–30$ кг/ m^2) – 20, с ожирением I степени (ИМТ $30–35$ кг/ m^2) – 9 %. Среди обследованных пациентов 23 % составляли лица с некомпенсированным послеоперационным гипопаратиреозом ($Ca_{общ} < 2,0$ ммоль/л). В контрольную группу (50 человек) вошли практически здоровые лица без отклонений в гормональном и биохимическом статусе: 36 женщин и 14 мужчин. Возрастной интервал – 20–45 лет, средний возраст – $31,1 \pm 1,0$ года.

Лица с ИМТ в пределах нормы составили 68 %, с избыточной массой тела – 20, с ожирением I степени – 12 %.

Оценку состояния миокарда проводили методом дисперсионного картирования электрокардиограммы (ДК ЭКГ) [17] с использованием приборно-программного обеспечения «Кардиовизор-06с» (ООО «Медицинские Компьютерные системы», Россия) по стандартной схеме, описанной в Руководстве пользователя «Кардиовизор-06с». Определяли интегральные индексы: «Миокард» (норма 0–14 %), «Ритм» (норма 0–40 %), «Пульс» (норма 60–80 уд/мин). С помощью программы «Варикард» проведена оценка variability сердечного ритма (BCP). В основе метода лежит анализ нормальных R–R-интервалов, измеряемых по ЭКГ за 5-минутный интервал времени с оценкой временных и спектральных показателей: стандартное отклонение полного массива кардиоинтервалов; показатель суммарной мощности вегетативной регуляции (SDNN, мс); квадратный корень из суммы разностей последовательного ряда кардиоинтервалов; показатель активности парасимпатического отдела регуляции (RMSSD, мс); число аритмий (Narr, %); стресс-индекс; показатель преобладания центральных механизмов регуляции над автономными (SI); мощность высокочастотной составляющей; показатель парасимпатической активности (HF, %); мощность низкочастотной составляющей; показатель симпато-вазомоторной активности (LF, %); показатель симпато-вагусного баланса (LF/HF); мощность очень медленных волн; показатель гормонально-метаболической активности (VLF, %); индекс централизации (IC). Оценивали также интегральный «показатель активности регуляторных систем» («ПАРС»), учитывающий на балльной основе отклонения параметров BCP от нормы (норма менее 4,0 балла).

Уровни гормонов в сыворотке крови (ТТГ (норма 0,39–6,13 мЕ/л), свободного тироксина (св. Т4, норма 0,8–2,0 нг/дл)) определяли ИФА-методом с использованием коммерческих наборов DRG (США), содержание Са в сыворотке крови (норма 2,02–2,70 ммоль/л) – с помощью наборов «Кормэй-Диана» (Польша).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета SPSS (версия 12.0). Поскольку многие из изучаемых показателей имели высокую variability и их распределение отличалось от нормального, предпочтение отдано непараметрическим методам статистики. Результаты представлены в виде медиан (Me), нижних и верхних перцентилей ([25; 75]). Для сравнительной оценки долей (частоты признаков, %) использовали критерий χ^2 с применением поправки Йейтса.

Результаты и их обсуждение. Все пациенты целевой группы имели супрессированные уровни ТТГ, не превышающие 0,5 мЕ/л. В табл. 1 представлены основные изучаемые характеристики у практически здоровых лиц и у пациентов целевой группы. Как видно из табл. 1, у пациентов целевой группы отмечались достоверно более низкие значения ТТГ и более высокие значения св. Т4, что обусловлено приемом супрессивных доз L-T4. Показатели «Миокард» и «ПАРС» (медиана в совокупности с верхними и нижними перцентильями) достоверно превышали уровень контроля. Остальные параметры не имели достоверных отличий.

Дальнейший анализ результатов проводили, исходя из предположения о наличии индивидуальной чувствительности у пациентов к L-T4. Медианы дозы L-T4 в подгруппах супрессии ТТГ (<0,1 мЕ/л) и умеренной супрессии (0,1–0,5 мЕ/л) достоверно не отличались (2,56 и 2,66 мкг/кг массы тела соответственно). Ранее было показано, что степень супрессии ТТГ в рамках целевых значений обусловлена индивидуальной чувствительностью пациентов [18], которая, в свою очередь, тесно связана с ИМТ [19]. Что касается ССС, то у пациентов с ВДРЦЖ на фоне приема супрессивных доз L-T4 с высокой частотой (до 18%) регистрировались изменения на ЭКГ в виде синдрома ранней реполяризации желудочков, причем у этих лиц выявлены также резкие изменения параметров рецепции трийодтиронина (Т3) [20]. Изучение рецепции Т3 показало, что у лиц с избыточной массой тела наблюдается достоверное повышение аффинности взаимодействия гормона с клетками-мишенями по сравнению с таковой у пациентов с нормальной массой тела, что объясняет сниженную потребность в L-T4 для достижения супрессивного эффекта у этих субъектов [21]. Таким образом, предварительные данные обосновывают дифференциальный подход в оценке состояния ССС у лиц с нормальной и избыточной массой тела на фоне проводимой супрессивной терапии левотироксином.

Как видно из рис. 1, регистрировались достоверные отличия по изучаемым показателям между пациентами с различными средними значениями ИМТ. У лиц с избыточной массой тела

Т а б л и ц а 1. Основные характеристики пациентов групп контроля и лиц, прооперированных по поводу ВДРЦЖ (Ме [25; 75])

Показатель	Контроль (n = 50)	Пациенты (n = 93)
Возраст, лет	30,7 [26,2–36,4]	30,7 [29,2–32,4]
ОТ, см	74,0 [68,0–82,0]	75,0 [69,0–85,0]
ИМТ, кг/м ²	22,5 [20,9–26,4]	22,8 [20,3–25,5]
ТТГ, мЕ/л	1,66 [0,97–2,40]	0,05 [0,01–0,17]*
Св. Т4, нг/дл	1,25 [1,12–1,40]	1,87 [1,69–2,00]*
Са, ммоль/л	2,35 [2,26–2,47]	2,20 [2,03–2,32]
АД сист., мм рт. ст.	115,5 [109,0–123,0]	117,0 [107,0–123,0]
АД диаст., мм рт. ст.	73,0 [69,0–81,0]	76,0 [70,0–81,0]
ЧСС, уд/мин	71,5 [65,0–79,0]	75,0 [67,0–83,0]
<i>Показатели ДК ЭКГ</i>		
«Миокард», %	14,0 [11,0–14,0]	14,0 [14,0–15,0]*
«Ритм», %	17 [10,0–36,0]	19 [10,0–35,0]
«Пульс», уд/мин	74 [69,0–79,0]	76 [69,0–83,0]
<i>Показатели вариабельности сердечного ритма</i>		
SDNN, мс	52,2 [38,2–73,5]	52,3 [35,5–195,5]
RMSSD, мс	43,0 [30,0–45,0]	42,0 [25,0–281,0]
CV, %	6,2 [4,5–9,8]	6,4 [4,3–25,7]
SI	81,5 [36,0–160,0]	63,0 [21,0–171,0]
Narr	0,0 [0,0–0,80]	0,0 [0,0–5,50]
TP, мс ²	2427 [935–5530]	2278 [946–24270]
HF, %	46,1 [29,7–64,2]	43,1 [27,4–56,0]
LF, %	34,5 [25,4–46,8]	40,1 [29,2–48,2]
VLF, %	13,3 [6,1–21,7]	15,1 [9,0–24,8]
LF/HF	0,83 [0,43–1,56]	1,02 [0,55–1,66]
IC	1,06 [0,56–2,37]	1,32 [0,796–2,65]
ПАРС, балл	5,0 [3,0–5,0]	5,0 [3,0–7,0]*

Пр и м е ч а н и е. * – достоверные отличия от контроля при $p < 0,05$.

наблюдалось достоверное повышение АД сист., АД диаст., а также некоторых показателей ВСР (SI, IC и VLF) по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с нормальной массой тела. Это свидетельствует о тенденции к развитию артериальной гипертензии, преобладании центрального контура регуляции и повышении активности нейрогуморальных механизмов на

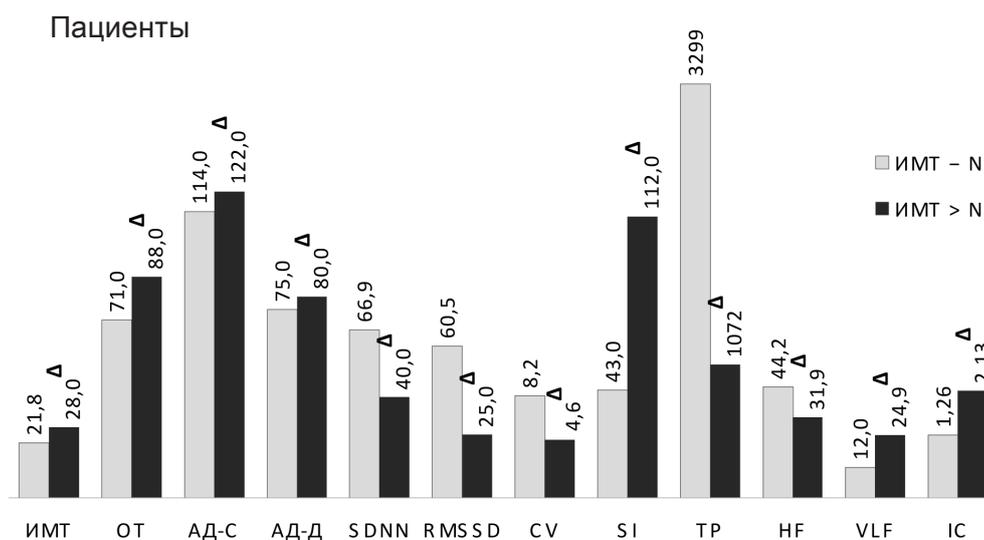


Рис. 1. Медианы показателей ВСР у пациентов с ВДРЦЖ в зависимости от ИМТ.
 Δ – достоверные отличия ($p < 0,05$) между подгруппами пациентов с различными ИМТ

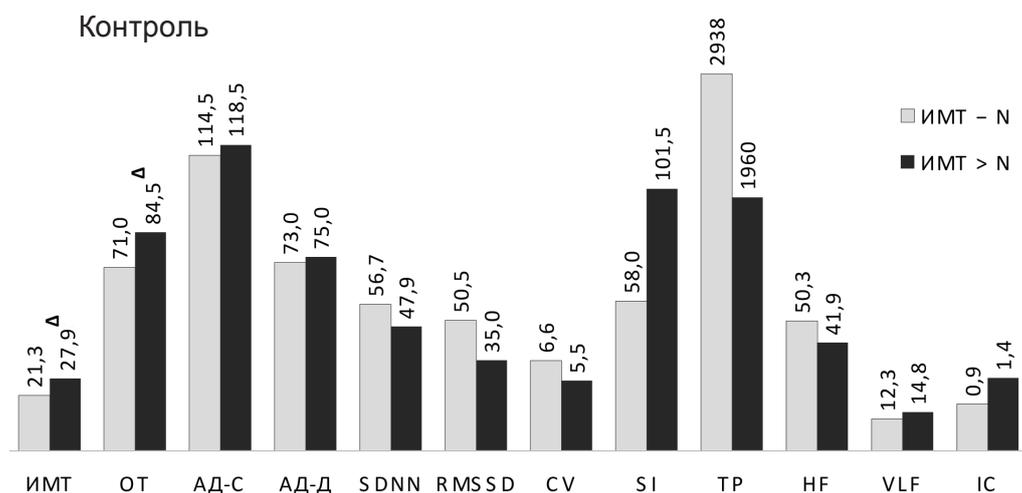


Рис. 2. Медианы показателей ВСП у практически здоровых лиц в зависимости от ИМТ.
^Δ – достоверные отличия ($p < 0,05$) между подгруппами пациентов с различными ИМТ

фоне супрессивной терапии левотироксином у лиц с избыточной массой тела. При этом у лиц с повышенным ИМТ отмечено достоверное снижение суммарной мощности вегетативной регуляции (SDNN), активности парасимпатического отдела регуляции (RMSSD), коэффициента вариации (CV), суммарного уровня активности регуляторных систем (TP) и активности парасимпатического отдела регуляции (HF) по сравнению с таковыми у пациентов с нормальной массой тела. Что касается практически здоровых лиц, то аналогичные тенденции проявлялись у них в меньшей степени и не достигали статистической значимости (рис. 2).

Далее проведен анализ частоты сниженных и повышенных значений показателей ВСП у практически здоровых лиц и у пациентов целевой группы исходя из общепринятых нормативов [22–24] (табл. 2).

Анализ данных табл. 2 показал, что у пациентов, получающих супрессивную терапию левотироксином и имеющих нормальную массу тела, отмечается повышение частоты высоких значений SDNN, RMSSD, CV и Narr, а также снижение частоты повышенных значений SI по сравнению с пациентами с избыточной массой тела. Проведение корреляционного анализа по Спирмену выявило положительную связь нарушений сердечного ритма (Narr) с такими показателями, как SDNN ($r = 0,51$) и RMSSD ($r = 0,57$), а также отрицательную корреляцию с SI ($r = -0,43$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что на фоне длительной супрессивной терапии у молодых пациентов с нормальной массой тела развивается тенденция к нарастанию количества аритмий, которая взаимосвязана с ростом ВСП. Исходя из этого, у данной группы пациентов важно оценивать выходящие за пределы нормы (в сторону повышения) значения SDNN, RMSSD и CV, поскольку эти сдвиги могут указывать на повышенный риск развития нарушений сердечного ритма [23].

Совершенно другая динамика отклонений показателей ВСП наблюдается у пациентов с избыточной массой тела (табл. 2). У этих пациентов с высокой частотой регистрируются сниженные по сравнению с нормой значения SDNN (29,6 %), RMSSD (37,0 %) на фоне повышенных значений стресс-индекса (44,4 %) и симпатикотонии (44,4 %), что указывает на снижение ВСП и доминирование симпатического отдела регуляции вегетативной нервной системы, являющимися крайне неблагоприятными прогностическими показателями [23, 24]. Следует отметить, что у практически здоровых лиц избыточная масса тела провоцирует сходные, но менее выраженные тенденции изменения параметров ВСП, не достигающие статистической значимости (табл. 2).

Таким образом, очевидно, что у пациентов с избыточной массой тела и ожирением, прооперированных по поводу ВДРЦЖ, наблюдается негативное влияние длительной супрессивной терапии левотироксином, которое в перспективе может привести к клинически значимому снижению ВСП.

Т а б л и ц а 2. Частота (%) сниженных и повышенных относительно нормы показателей ВСР у лиц контрольной группы и у пациентов с ВДРЦЖ в зависимости от ИМТ

Показатель	Контроль		Пациенты	
	ИМТ норма (n = 34)	ИМТ > нормы (n = 16)	ИМТ норма (n = 66)	ИМТ > нормы (n = 27)
SDNN < 30 мс	8,8	6,3	3,0	29,6^D
SDNN < 20 мс	2,9	0	2,9	7,4
SDNN > 100 мс	29,4	6,3	42,4	11,1 ^D
SDNN > 200 мс	14,7	6,3	33,0*	3,7 ^D
RMSSD < 20 мс	8,8	18,8	7,6	37,0^D
RMSSD < 15 мс	0	0	1,5	22,2^D
RMSSD > 50 мс	50,0	25,0	57,8	22,2 ^D
RMSSD > 100 мс	29,4	12,5	42,4	11,1 ^D
CV < 3 %	5,9	6,3	3,0	7,4
CV > 12 %	29,4	12,5	39,4	11,1 ^D
SI < 50	44,1	12,5 ^D	53,0	18,5 ^D
SI > 150	20,6	37,5	21,2	44,4^D
IC < 2	67,6	75,0	77,3	48,1 ^D
IC > 8	0	0	4,5	11,1
Narr > 4	14,7	6,3	37,9	11,1 ^D
Narr > 8	5,9	6,3	25,8	3,7 ^D
HF < 10 %	0	0	3,0	11,1
HF > 30 %	73,5	87,5	77,3	51,8
LF < 15 %	0	0	3,0	3,7
LF > 45 %	32,3	25,0	34,8	37,0
VLf < 20 %	7,5	62,5	72,7	44,4
VLf > 60 %	0	0	1,5	0
LF/HF < 0,5	32,3	25,0	24,2	14,8
LF/HF > 1,6	23,5	18,8	21,2	44,4^D

П р и м е ч а н и е. Достоверные отличия ($p < 0,05$): * – от контроля; ^Δ – между подгруппами с различными ИМТ.

Известно, что гипокальциемия может приводить к нарушениям со стороны ССС, а у пациентов, прооперированных по поводу ВДРЦЖ, сниженные уровни паратгормона встречаются примерно в 40 % случаев, некомпенсированный гипопаратиреоз – в 27–29 % случаев [25]. Поэтому у пациентов целевой группы проведен анализ изучаемых показателей в зависимости от уровня Са в крови. Как видно из рис. 3, снижение уровня Са за пределы нормы приводит к достоверному снижению среднего уровня RMSSD, тенденции к снижению SDNN и достоверному повышению стресс-индекса (SI).

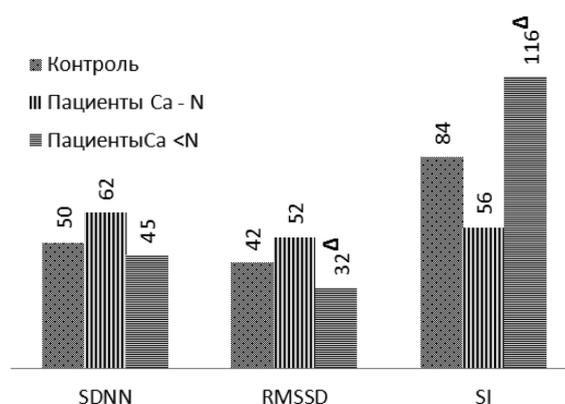


Рис. 3. Медианы показателей ВСР у пациентов с ВДРЦЖ в зависимости от уровня кальция в крови.
^Δ – достоверные отличия ($p < 0,05$) между подгруппами пациентов с различными уровнями Са

Т а б л и ц а 3. Процент отклонений от нормы основных показателей ВСП у практически здоровых лиц с нормальным уровнем Са в крови и у пациентов с ВДРЦЖ в зависимости содержания кальция в крови

Показатель	Контроль (n = 46)	Пациенты	
		Са норма (n = 72)	Са < нормы (n = 21)
SDNN < 30 мс	8,7	15,3	28,5*
SDNN < 20 мс	2,2	1,4	14,3^Δ
SDNN > 100 мс	19,6	36,1	23,8
SDNN > 200 мс	13,0	27,8	14,3
RMSSD < 20 мс	13,0	11,1	33,3^Δ
RMSSD < 15 мс	0	5,6	14,3*
RMSSD > 50 мс	41,3	51,4	33,3
RMSSD > 100 мс	21,7	36,1	23,8
Narr > 4	13,0	33,4*	19,0
SI < 50	32,6	48,6	23,8
SI > 150	28,3	26,4	33,3
IC < 2	67,4	72,3	57,1
IC > 8	0	2,8	19,0*
LF/HF > 1,6	23,9	23,6	42,8
LF/HF > 2,0	17,4	15,3	38,1^Δ
ПАРС > 4,0	56,5	63,9	71,4

Примечание. Достоверные отличия ($p < 0,05$): * – от контроля; ^Δ – между подгруппами с различными ИМТ.

Оценка частоты отклонений показателей от нормы (табл. 3) подтвердила, что у лиц с некомпенсированным уровнем Са в крови наблюдается достоверно более высокий процент сниженных значений SDNN и RMSSD. У этой категории пациентов с высокой частотой отмечались повышенные значения IC (19 %), LF/HF (42,8 %), ПАРС (71,4 %), что свидетельствует о преобладании симпатической активности и высокой степени централизации управления сердечным ритмом, а также о тенденции к нарастанию отклонений интегрального показателя ВСП – ПАРС (табл. 3).

Проведенное более 10 лет тому назад Холтеровское мониторирование молодых пациентов с ВДРЦЖ, получающих комплексное лечение около 3–4 лет, показало существенное нарастание у них количества предсердных экстрасистол (медиана 101,0 против 22,5 в контроле) и нарастание коэффициента (симпато-вагусного баланса) LF/HF [26]. У пациентов со сниженным уровнем Са в крови отмечалось резкое уменьшение количества предсердных экстрасистол, достигающее уровня контроля (медиана 24,5), а также тенденция к уменьшению эпизодов синусовых тахикардий (медиана 11,0 по сравнению с медианой 20,0 без гипопаратиреоза) [26]. В наших исследованиях также показано, что характерное для большинства пациентов с ВДРЦЖ нарастание числа аритмий (предположительно предсердных экстрасистол) и повышенных значений SDNN и RMSSD можно обнаружить только при нормальном уровне Са в крови. При некомпенсированном гипопаратиреозе эти сдвиги не проявляются и создают ложную картину нормализации типичных для супрессивной терапии отклонений ВСП. Полученные данные показывают, что при мониторинге пациентов с ВДРЦЖ крайне важно компенсировать состояние гипопаратиреоза, так как оно, во-первых, маскирует истинное состояние ССС, а во-вторых, является фактором риска снижения ВСП. В подгруппе пациентов со сниженным уровнем Са в крови регистрируется также нарастание числа повышенных значений индекса централизации (IC) по сравнению с таковым в группе контроля и превалирование симпатического тонуса ВНС в виде повышенного числа значений LF/HF (>2,0) по сравнению с аналогичным показателем у лиц с нормальным уровнем Са в крови. Эти данные свидетельствуют о напряжении регуляторных механизмов у пациентов со сниженным уровнем Са в крови.

Проведенные исследования и данные литературы [26] позволяют рекомендовать перечень показателей (табл. 4), оценка которых позволит сформировать группы риска развития БСК среди пациентов, прооперированных по поводу ВДРЦЖ и длительное время (более 10 лет) получающих лечение супрессивными дозами L-T4.

Т а б л и ц а 4. Отклонения от нормы показателей, указывающие на риск БСК у пациентов, длительное время получающих супрессивную терапию L-T4

Показатель	Умеренное отклонение	Выраженное отклонение
<i>Первичный медицинский осмотр</i>		
Са сыворотки крови, ммоль/л	1,8–2,0	<1,8
ЧСС, уд/мин	80–90	>90
АД сист., мм рт. ст.	130–140	>140
АД диаст., мм рт. ст.	80–90	>90
ИМТ, кг/м ²	25–30	>30
ОТ, см:		
мужчины	94–104	>104
женщины	80–90	>90
<i>Показатели вариабельности сердечного ритма</i>		
SDNN, мс	20–30/150–200	<20/>200
RMSSD, мс	15–20/100–150	<15/>150
Симпато-вагусный баланс (LF/HF)	1,6–2,0	>2,0
Стресс-индекс (SI)	150–200	>200
Индекс централизации (IC)	8–10	>10

Общеизвестно, что стабильное повышение АД и ЧСС является клинически неблагоприятным признаком и требует полного кардиологического обследования, что указано в целом ряде публикаций [8, 10–13]. Однако выявление донозологических изменений со стороны ССС требует более детального подхода. Как показывают проведенные исследования, важнейшим показателем, влияющим на состояние ССС, является уровень Са в крови, поэтому нормализация гипокальциемии выдвигается на первый план в ряду медико-профилактических мероприятий у пациентов с ВДРЦЖ. У пациентов с нормальными ИМТ показателями риска БСК являются такие отклонения ВСР, как нарастание SDNN и RMSSD и снижение SI и IC за пределы нормы. У пациентов с повышенным ИМТ неблагоприятными являются сдвиги в сторону снижения SDNN и RMSSD, а также повышение SI и LF/HF по сравнению с нормальными значениями. При выявлении стойких отклонений ВСР за пределы нормы целесообразно провести полное кардиологическое обследование пациентов, длительное время получающих супрессивную терапию L-T4, и рассмотреть вопрос о снижении дозы L-T4.

Выводы

1. При проведении медицинского осмотра пациентов с ВДРЦЖ рекомендуется оценивать антропометрические показатели, ЧСС, АД и уровень Са в сыворотке крови, а также проводить кардиоинтервалографию с дифференцированной оценкой показателей вариабельности сердечного ритма в разных подгруппах пациентов.
2. Пациентам с некомпенсированным гипопаратиреозом необходимо назначать препараты Са и витамина Д3 с целью нормализации уровня Са в крови и контролировать показатели ВСР (SDNN, RMSSD, IC и LH/HF) на фоне нормализации фосфорно-кальциевого обмена.
3. Для пациентов с нормальной массой тела и нормальным уровнем Са в крови наиболее частыми неблагоприятными сдвигами ВСР являются повышенные значения SDNN и RMSSD, за пределы нормы.
4. Для пациентов с избыточной массой тела и ожирением наиболее характерными неблагоприятными сдвигами являются сниженные значения SDNN и RMSSD, а также повышенные значения SI и LH/HF за пределы нормы.
5. Проведение медицинского осмотра с учетом вышеперечисленных показателей позволит выявлять неблагоприятные сдвиги со стороны ССС на ранних стадиях их формирования и проводить соответствующие медико-профилактические мероприятия, направленные на предупреждение БСК у пациентов, длительное время получающих супрессивную терапию левотироксинном.

Список использованной литературы

1. Revised management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer / D. S. Cooper [et al.] // *Thyroid*. – 2009. – Vol. 19. – P. 1167–1214.
2. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium / F. Pacini [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2006. – Vol. 54. – P. 787–803.
3. Румянцев, П. О. Современные принципы терапии левотироксином после операции у больных высокодифференцированным раком щитовидной железы / П. О. Румянцев, С. В. Корнев, У. В. Румянцева // *Опухоли головы и шеи*. – 2013. – № 2. – С. 5–8.
4. Biondi, B. Thyroid-hormone therapy and thyroid cancer: a reassessment / B. Biondi, S. Filetti, M. Schlumberger // *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 1. – P. 32–40.
5. Brabant, G. Thyrotropin suppressive therapy in thyroid carcinoma: what are the targets? / G. Brabant // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 93. – P. 1167–1169.
6. Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum thyroglobulin measurement / C. A. Spencer [et al.] // *Thyroid*. – 1999. – Vol. 9. – P. 435–441.
7. Diagnostic value of a single serum thyroglobulin determination on and off thyroid suppressive therapy in the follow-up of patients with differentiated thyroid cancer / F. Pacini [et al.] // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. – 1985. – Vol. 23. – P. 405–411.
8. Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований / под ред. О. Г. Суконко, С. А. Красного. – Минск: Проф. издания, 2012. – С. 440–451.
9. Biondi, B. Benefits of thyrotropin suppression versus the risks of adverse effects in differentiated thyroid cancer / B. Biondi, D. S. Cooper // *Thyroid*. – 2010. – Vol. 20. – P. 135–145.
10. Chronic thyrotropin-suppressive therapy with levothyroxine and short-term overt hypothyroidism after thyroxine withdrawal are associated with undesirable cardiovascular effects in patients with differentiated carcinoma / J. I. Botella-Carretero [et al.] // *Endocrinol.-Relat. Cancer*. – 2004. – Vol. 11. – P. 345–356.
11. Effects of TSH-suppressive therapy on cardiac morphology and function: beneficial effects of the addition of beta-blockade on diastolic dysfunction / S. Gullu [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2004. – Vol. 150. – P. 655–661.
12. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death / A. W. Haider [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1998. – Vol. 32. – P. 1454–1459.
13. Bonow, R. O. Left ventricular diastolic dysfunction as a cause of congestive heart failure / R. O. Bonow, J. E. Udelson // *Ann. Intern. Med.* – 1992. – Vol. 117. – P. 502–510.
14. Low serum thyrotropin concentrations as a risk factor for atrial fibrillation in older persons / C. T. Sawin [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1994. – Vol. 331. – P. 1249–1252.
15. Thyroid status, cardiovascular risk, and mortality in older adults / A. R. Cappola [et al.] // *JAMA*. – 2006. – Vol. 295. – P. 1033–1041.
16. Бокерия, О. Л. Фибрилляция предсердий при субклинической форме гипертиреоза (патогенез, клиника, лечение, прогноз) / О. Л. Бокерия, И. В. Волковская // *Анналы аритмологии*. – 2013. – Т. 10, № 4. – С. 201–209.
17. Иванов, Г. Г. Дисперсионное ЭКГ картирование: теор. основы и клин. практика / Г. Г. Иванов, А. С. Сула. – М.: Техносфера, 2009. – 190 с.
18. Тиреоидный статус пациентов с карциномой щитовидной железы в зависимости от длительности супрессивной терапии тироксином / Т. А. Митюкова [и др.] // *Вест. НАН Беларуси. Сер. мед. наук*. – 2014. – № 2. – С. 62–67.
19. Оценка индивидуальной чувствительности к тироксинотерапии / Т. А. Митюкова [и др.] // *Вест. НАН Беларуси. Сер. мед. наук*. – 2014. – № 2. – С. 81–89.
20. Влияние тироксина на сердечно-сосудистую систему и рецепцию трийодтиронина у пациентов с карциномой щитовидной железы / Т. А. Митюкова [и др.] // *Вест. НАН Беларуси. Сер. мед. наук*. – 2010. – № 1. – С. 92–98.
21. Основные характеристики специфического связывания трийодтиронина с клетками-мишенями у пациентов с карциномой щитовидной железы на фоне лечения / Т. А. Митюкова [и др.] // *Докл. НАН Беларуси*. – 2015. – Т. 59, № 6. – С. 91–96.
22. Фролов, А. В. Контроль механизмов адаптации сердечной деятельности в клинике и спорте / А. В. Фролов. – Минск: Полипринт, 2011. – 216 с.
23. Яблучанский, Н. И. Вариабельность сердечного ритма в современной клинике / Н. И. Яблучанский, Б. Я. Кантор, А. В. Мартыненко. – Харьков, 2001. – 240 с.
24. Электрическая нестабильность миокарда: механизмы развития, диагностика, клин. значение / А. В. Фролов [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2014. – 229 с.
25. Леонова, Т. А. Реабилитация пациентов с карциномой щитовидной железы на фоне особенностей фосфорно-кальциевого обмена / Т. А. Леонова // *Реабилитация пациентов с радиоиндуцированным раком щитовидной железы* / под ред. В. М. Дрозд, Ю. Е. Демидчика, И. Бранована, К. Райнерса. – Минск: Беларус. комитет «Дети Чернобыля», 2010. – С. 56–73.
26. Артишевский, С. Н. Вегетативная регуляция сердечного ритма у больных с патологией щитовидной железы на фоне супрессивной терапии L-тироксинотерапией: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.06; 14.00.03 / С. Н. Артишевский; Респ. науч.-практ. центр «Кардиология» Мин-ва здравоохр. Респ. Беларусь. – Минск, 2004.

Поступила в редакцию 04.04.2016

УДК 537.531+591.463.1

Н. В. ЧУЕШОВА

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ КРАТКОВРЕМЕННОГО
И ДЛИТЕЛЬНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ОБЛУЧЕНИЯ (1800 МГц)
НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ КРЫС-САМЦОВ**

Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Беларусь, e-mail: natalya-chueshova@tut.by

Изучено влияние кратковременной (7 дней) и длительной (90 дней) электромагнитной экспозиции от мобильного телефона (1800 МГц) на массу органов репродуктивной системы, сперматогенез, качество и количество эпидидимальных сперматозоидов крыс-самцов, облучение которых начинали с неполовозрелого возраста. Установлены значительные изменения изучаемых показателей на 1-е и 30-е сутки после воздействия, более выраженные при кратковременном облучении. Показано, что электромагнитная экспозиция вызывает достоверное падение жизнеспособности зрелых половых клеток, что может отразиться на фертильности животных.

Ключевые слова: крысы-самцы, электромагнитное облучение мобильным телефоном (1800 МГц), семенник, эпидидимис, семенные пузырьки, сперматогенез, сперматогенные клетки, сперматозоиды, жизнеспособность, индекс DFI.

N. V. CHUESHOVA

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECTS OF SHORT AND LONG ELECTROMAGNETIC RADIATION
(1800 MHz) ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE RATS**

*Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Gomel, Belarus, e-mail: natalya-chueshova@tut.by*

The effect of short (7 days) and long (90 days) electromagnetic radiation from mobile phone (1800 MHz) on the weight of reproductive organs, the spermatogenesis, the quality and number of epididymal sperms of male rats, who underwent radiation at the sexually immature age, were studied. It was established that on the 1st and 30th days after exposure, significant changes in the considered parameters were revealed, which were more pronounced at short-term radiation. Electromagnetic radiation caused a significant drop in the viability of mature sex cells, which may affect the fertility of animals.

Keywords: male rats, electromagnetic radiation from mobile phone (1800 MHz), testis, epididymis, seminal vesicles, spermatogenesis, spermatogenic cells, spermatozoa, viability, index DFI.

Введение. Мобильная связь является неотъемлемой частью современных средств коммуникации, что подтверждается числом зарегистрированных пользователей, которое, по оценке ВОЗ, в 2014 г. достигало 6,9 млрд [1]. Мобильные телефоны в режиме разговора, несмотря на низкую интенсивность излучения, могут представлять определенную опасность для здоровья людей, особенно для развивающегося организма. В ряде исследований установлено, что их длительное использование вызывает не только отклонения в состоянии ЦНС, но и биологические эффекты в кроветворной, эндокринной, иммунной и репродуктивной системах [2, 3], повышает риск развития онкологических заболеваний в мозге [4]. В связи с этим в 2011 г. Международное агентство исследования рака ВОЗ (IARC) классифицировало электромагнитное поле (ЭМП) сотовых телефонов как возможный канцерогенный фактор для людей, присвоив ему группу канцерогенной опасности 2B [5].

Изучение морфофункционального состояния репродуктивной системы как одной из наиболее радиочувствительных систем организма является актуальной задачей исследования. В ряде работ показана связь между использованием мобильного телефона и уязвимостью процес-

са сперматогенеза и зрелых половых клеток к облучению [6]. В большинстве работ, оценивающих электромагнитное воздействие мобильной связи на мужскую репродуктивную систему, рассматривается частота 900 МГц. Широкое внедрение мобильной связи стандарта GSM 1800 МГц привело к необходимости изучения особенностей такого воздействия на организм, так как известно, что частота электромагнитных излучений оказывает влияние на биологические объекты [7].

Цель настоящей работы – комплексная оценка состояния различных звеньев репродуктивной системы крыс-самцов, подвергнутых кратковременному и длительному электромагнитному облучению от мобильного телефона (1800 МГц), начиная с половозрелого возраста.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах стадного разведения (исходный возраст 50–52 дня), находившихся на стандартном пищевом рационе вивария и имевших свободный доступ к питьевой воде. Контролем служили животные аналогичного возраста и пола ($n = 5-6$), содержащиеся в таких же условиях, но без электромагнитного воздействия. Животных подвергали воздействию ЭМП мобильного телефона (1800 МГц) ежедневно (8 ч/день), фракциями по 30 мин с интервалом 5 мин, на протяжении 7 и 90 дней. Опыты выполняли на 1-е и 30-е сутки после прекращения экспозиции.

Источником электромагнитного излучения (ЭМИ) являлась изготовленная в БГУИР (г. Минск) экспериментальная установка мобильной связи, позволяющая имитировать сигнал мобильного телефона (1800 МГц) в режиме разговора. В качестве излучателя ЭМИ, сформированного в соответствии со стандартом GSM, применялась штыревая четвертьволновая антенна, соединенная коаксиальным кабелем длиной 5 м с антенным разъемом на телефоне распространенной марки. Антенна размещалась на высоте 0,35 м в центральной части рабочей зоны (размер $1 \times 0,7$ м). В зоне находились 4 пластиковые клетки с животными. Во время облучения осуществляли дистанционный контроль наличия ЭМП. В клетке плотность потока электромагнитной энергии, которую измеряли прибором ПЗ-30 на частоте 1800 МГц, составляла 2,0–20,0 мкВт/см².

Предварительно взвешенных животных подвергали декапитации, выделяли семенники с эпидидимисами и семенные пузырьки, массу которых оценивали с точностью до 1 мг, затем производили расчет относительной массы выделенных органов. Анализ состава сперматогенных клеток в клеточной суспензии, полученной из тестикулярной ткани, проводили методом ДНК-проточной цитометрии (цитофлуориметр Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США), как описано ранее в работе [8]. В сперматозоидах, полученных из придатка семенника, определяли их количество, жизнеспособность и индекс DFI (фрагментация ДНК) методом SCSA [9].

Полученный экспериментальный материал обрабатывали общепринятыми методами биологической статистики, используя пакеты программ Excel и GraphPad Prism 5. При сравнении двух независимых групп по количественному признаку использовали *t*-критерий Стьюдента в случае нормального распределения признака в обеих группах (тест Шапиро–Уилка) и критерий Манна–Уитни при несоответствии распределения эмпирическому закону нормального распределения. Статистически значимыми считали различия между контрольной и опытной группами при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При анализе показателей массы органов репродуктивной системы крыс-самцов на 1-е сутки после воздействия наиболее существенные изменения выявлены при кратковременном воздействии ЭМИ в течение 7 сут (см. таблицу). Так, если увеличение абсолютной и относительной массы семенников и эпидидимисов после длительной экспозиции было несущественным, то после 7-дневного облучения отмечалось увеличение абсолютной и относительной массы эпидидимисов на 38,5 и 20,0 % ($p < 0,05$), а семенных пузырьков более значительное – на 93,0 и 70,0 % ($p < 0,05$) соответственно.

По сравнению с 1-ми сутками на 30-е сутки после облучения (1800 МГц) реакция исследуемых органов имела некоторые особенности, которые выражались в тенденции к снижению изучаемых показателей при кратковременной экспозиции и, напротив, к их повышению после длительного облучения, имевшее достоверный характер для абсолютной массы семенников.

Что касается количественного состава популяций сперматогенных клеток крыс в ткани семенника на 1-е сутки после кратковременной экспозиции (7 дней), отмечалось достоверное снижение количества сперматогоний (клеток начального звена сперматогенеза) на 25,7 %, круглых

Изменение массы тела и органов репродуктивной системы крыс-самцов на 1-е и 30-е сутки после 7- и 90-дневного электромагнитного облучения от мобильного телефона (1800 МГц, 8 ч/день)

Исследуемый показатель	Сроки после облучения			
	1-е сутки		30-е сутки	
	Контроль	ЭМИ	Контроль	ЭМИ
7 дней облучения				
Масса тела, г	139,6 ± 8,6	156,1 ± 4,7	254,8 ± 11,5	239,5 ± 15,6
АМ семенников, г	0,89 ± 0,07	1,05 ± 0,06	1,39 ± 0,05	1,29 ± 0,05
ОМ семенников, %	0,63 ± 0,02	0,68 ± 0,04	0,55 ± 0,03	0,54 ± 0,03
АМ эпидидимисов, г	0,13 ± 0,01	0,18 ± 0,01*	0,38 ± 0,01	0,34 ± 0,03
ОМ эпидидимисов, %	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01*	0,15 ± 0,07	0,14 ± 0,01
АМ семенных пузырьков, г	0,14 ± 0,01	0,27 ± 0,03*	1,04 ± 0,06	0,80 ± 0,10
ОМ семенных пузырьков, %	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,02*	0,42 ± 0,04	0,33 ± 0,03
90 дней облучения				
Масса тела, г	353,0 ± 11,9	357,67 ± 15,7	337,75 ± 7,3	356,50 ± 14,9
АМ семенников, г	1,61 ± 0,08	1,63 ± 0,03	1,43 ± 0,05	1,66 ± 0,07*
ОМ семенников, %	0,46 ± 0,01	0,46 ± 0,03	0,42 ± 0,01	0,47 ± 0,03
АМ эпидидимисов, г	0,48 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,52 ± 0,04
ОМ эпидидимисов, %	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01
АМ семенных пузырьков, г	1,16 ± 0,08	1,34 ± 0,08	1,65 ± 0,07	1,69 ± 0,20
ОМ семенных пузырьков, %	0,34 ± 0,17	0,38 ± 0,03	0,49 ± 0,24	0,47 ± 0,07

Примечание. АМ – абсолютная масса, ОМ – относительная масса. * – достоверно при $p < 0,05$.

сперматид (81,0 %) и значительное повышение числа продолговатых сперматид (187,7 %). На 1-е сутки после 90-дневного облучения наблюдалось достоверное повышение количества сперматогоний (до 113,6 %) и снижение числа удлинённых сперматид (до 80,18 %), в то время как содержание других форм клеток не отличалось от контроля (рис. 1).

Характер изменений исследуемых показателей на 30-е сутки после электромагнитной экспозиции (1800 МГц) указывает на различную чувствительность сперматогенных клеток тестикулярной ткани к облучению в течение 7 и 90 дней. Об этом свидетельствует ускорение дифференцировки сперматогенных клеток на начальном этапе сперматогенеза (увеличение количества сперматозоидов первого порядка на 39,1 и 44,9 % соответственно, $p < 0,05$) после кратковременного облучения и его замедление на стадии удлинённых и продолговатых сперматид (со-

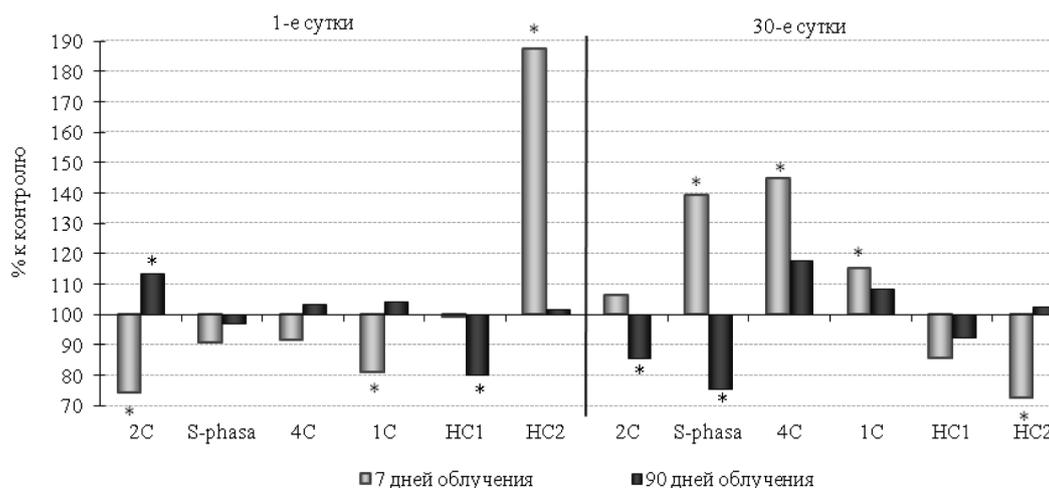


Рис. 1. Изменение распределения популяций сперматогенных клеток в тестикулярной ткани крыс-самцов на 1-е и 30-е сутки после воздействия излучения от мобильного телефона (1800 МГц) в течение 7 и 90 дней (8 ч/день). 2С – сперматогонии, S-phasa – сперматозоиды в прелептотене, 4С – сперматозоиды I порядка, 1С, HC1 и HC2 – круглые, удлинённые и продолговатые сперматиды. * – достоверно при $p < 0,05$

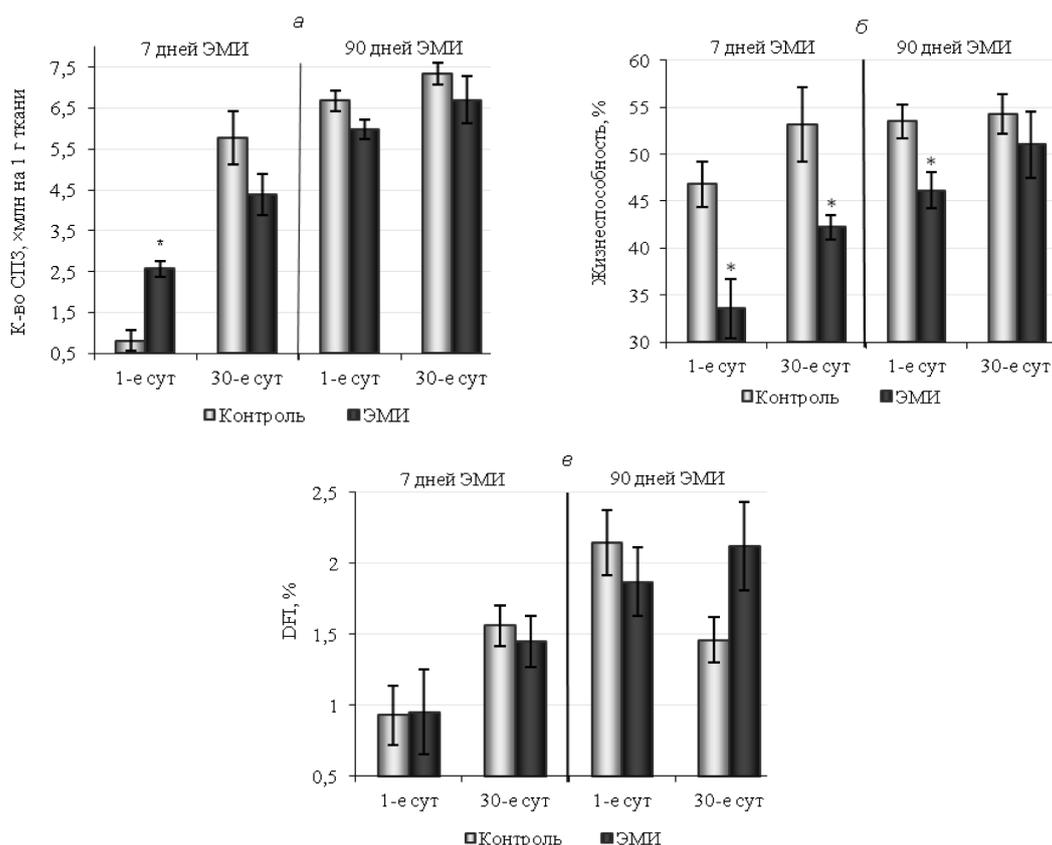


Рис. 2. Изменение количества сперматозоидов (а), выделенных из эпидидимисов, их жизнеспособности (б) и индекса DFI (в) на 1-е и 30-е сутки после воздействия излучения от мобильного телефона (1800 МГц) в течение 7 и 90 дней (8 ч/день). СПЗ – сперматозоид. * – достоверно при $p < 0,05$

ответственно до 88,1 и 72,5 %, $p < 0,05$). Напротив, длительное электромагнитное воздействие (90 дней) в основном вызывало торможение дифференцировки сперматогенных клеток, что подтверждалось достоверным снижением числа сперматогоний и прелептотенных сперматоцитов (S-фаза) – на 14,29 и 24,22 % соответственно.

Анализ количества сперматозоидов, выделенных из эпидидимисов на 1-е сутки, после электромагнитного воздействия в течение 7 дней показал трехкратное повышение их содержания ($p < 0,05$), однако жизнеспособность этих клеток снизилась, составив 71,8 % ($p < 0,05$). При длительной экспозиции (90 дней) в этот период наблюдалось достоверное уменьшение числа эпидидимальных сперматозоидов и снижение их жизнеспособности до 89,5 и 86,3 % (рис. 2).

В отдаленном периоде после прекращения кратковременного и продолжительного электромагнитного воздействия сохранялись сниженное количество эпидидимальных сперматозоидов и их низкая жизнеспособность, которые в большей степени проявились после 7-дневного облучения. Следует иметь в виду, что падение жизнеспособности зрелых половых клеток может негативно отразиться на их оплодотворяющей способности. Об уменьшении жизнеспособности, подвижности и антиоксидантной активности сперматозоидов и других свойств эпидидимисов животных, облученных в диапазоне мобильной связи 915 и 950 МГц, сообщается также в работах [10, 11].

В настоящее время определение индекса DFI (фрагментация ДНК) в сперматозоидах позволяет судить о целостности структуры биополимера, который определяет оплодотворяющую способность половой клетки. Полученные нами данные свидетельствуют об отсутствии изменений данного показателя на 1-е сутки после кратковременного и длительного электромагнитного облучения. Однако на 30-е сутки после 90-дневной экспозиции отмечалась тенденция к его повышению (до 144,8 %).

По результатам большинства исследований, наиболее выраженные изменения в состоянии репродуктивной системы самцов при воздействии ЭМП диапазона мобильной связи выявляются в структуре тестикулярной ткани, количественных и качественных показателей сперматозоидов, выделенных из эпидидимиса. У облученных животных снижается диаметр семенных канальцев, нарушается структура тестикулярной ткани, гипосперматогенез, падает подвижность, жизнеспособность клеток, повышается число аномальных сперматозоидов [12–16]. Полученные нами данные в основном соответствуют приведенным выше, однако следует учитывать по крайней мере два фактора, имеющих большое значение в опосредовании эффектов воздействия электромагнитного излучения на организм в целом и репродуктивную систему самцов в частности, – возраст животных и продолжительность экспозиции. Реакция молодых животных на облучение обычно более выраженная, а в отдаленном периоде у них наблюдается ускоренное восстановление исследуемых показателей. Кратковременное облучение сопровождается, как правило, стимуляционными эффектами, что подтверждается повышением массы эпидидимисов и семенных пузырьков, количеством сперматид в сперматогенной ткани и зрелых половых клеток, выделенных из эпидидимиса при 7-дневной экспозиции. В то же время при длительном облучении имеет место определенная адаптация к действующему фактору некоторых исследуемых показателей репродуктивной системы, за исключением жизнеспособности половых клеток. По-видимому, данный показатель является одним из наиболее чувствительных к электромагнитному облучению в диапазоне радиочастот.

Заключение. Электромагнитное излучение различной продолжительности (7 и 90 дней, 8 ч/день) от мобильного телефона (1800 МГц) сопровождается изменениями массы семенников, эпидидимисов и особенно семенных пузырьков, кинетики процесса сперматогенеза, количественных и качественных показателей сперматозоидов, выделенных из эпидидимисов, выраженность которых в значительной мере определяется продолжительностью действия изучаемого фактора. Кратковременная экспозиция в большинстве случаев вызывает более существенные отклонения исследуемых показателей, что подтверждается повышением массы органов репродуктивной системы (эпидидимисов и семенных пузырьков), диспропорцией клеточного состава сперматогенного эпителия, увеличением числа сперматид в тестикулярной ткани и эпидидимальных сперматозоидов и снижением их жизнеспособности. Очевидно, что более высокая чувствительность крыс-самцов к электромагнитному облучению при 1800 МГц обусловлена их возрастом, т. е. большей уязвимостью репродуктивной системы самцов неполовозрелого возраста. При длительной электромагнитной экспозиции наблюдаются умеренные отклонения исследуемых показателей репродуктивной системы крыс-самцов, что указывает на относительную адаптацию сперматогенного эпителия и зрелых половых клеток к действующему фактору. В то же время при длительной электромагнитной экспозиции негативное действие в отношении такого показателя, как жизнеспособность сперматозоидов, сохраняется.

Причины наблюдаемых изменений обусловлены эффектами электромагнитного излучения в диапазоне мобильной связи (1800 МГц), которая, несмотря на ее низкую интенсивность, способна вызывать структурные нарушения тестикулярной ткани, снижение интенсивности сперматогенеза, а также изменение количественных и качественных характеристик сперматозоидов, выделенных из эпидидимиса. Выявленные изменения рассматриваются в связи с биохимическими, молекулярными и регуляторными процессами в ткани семенника и зрелых половых клетках, состояние которых при электромагнитной экспозиции зависит также от истощения ресурсов антиоксидантной системы, устойчивости мембран, апоптоза половых клеток, активности гормонпроизводящих клеток Лейдига и других факторов [3, 17].

Список использованной литературы

1. WHO. Electromagnetic fields and public health: mobile phone. Fact sheet. – October 2014. – N 193.
2. Григорьев, Ю. Г. Сотовая связь и здоровье: электромагнитная обстановка, радиобиологические и гигиенические проблемы, прогноз опасности / Ю. Г. Григорьев, О. А. Григорьев. – М.: Экономика, 2013. – 565 с.
3. Верещако, Г. Г. Электромагнитное излучение диапазона мобильной связи и его влияние на мужскую репродуктивную систему и потомство / Г. Г. Верещако. – Минск: Беларус. навука, 2014. – 190 с.

4. Case-control study of the association between malignant brain tumours diagnosed between 2007 and 2009 and mobile and cordless phone use / L. Hardell [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2013. – Vol. 43. – P. 1833–1845.
5. IARC classifies radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans // WHO. Press Release. – 2011. – N 208.
6. Association between mobile phone use semen quality: a systemic review and meta-analysis / K. Liu [et al.] // *Andrology.* – 2014. – Vol. 2. – P. 491–501.
7. Кудряшов, Ю. Б. Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения: учебник для вузов / Ю. Б. Кудряшов, Ю. Ф. Перов, А. Б. Рубин. – М.: Физматлит, 2008. – 184 с.
8. Состояние репродуктивной системы крыс-самцов первого поколения, полученных от облученных родителей и подвергнутых воздействию ЭМИ (897 МГц) в период эмбриогенеза и постнатального развития / Г. Г. Верещако [и др.] // *Радиц. биология. Радиоэкология.* – 2014. – Т. 54, № 2. – С. 442–450.
9. Evenson, D. P. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques / D. P. Evenson, K. L. Larson, L. K. Jost // *Andrology.* – 2002. – Vol. 23, N 1. – P. 25–43.
10. The effects of cell phone waves (900 MHz-GSM band) on sperm parameters and total antioxidant capacity in rats / M. Ghanbari [et al.] // *Int. J. Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 7, N 1. – P. 21–28.
11. Effects of microwaves (950 MHz mobile phone) on morphometric and apoptotic changes of rabbit epididymis / E. Azadi Oskouyi [et al.] // *Andrologia.* – 2015. – Vol. 47 – P. 700–705.
12. Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats / S. Dasdag [et al.] // *Urol. Res.* – 1999. – Vol. 27. – P. 219–223.
13. Effect of chronic low-intensity microwave radiation on sperm count, sperm morphology, and testicular and epididymal tissues of rats / Z. Akdag [et al.] // *Electro Magnetobiol.* – 1999. – Vol. 18. – P. 133–145.
14. Hypospermatogenesis and Spermatozoa Maturation Arrest in Rats Induced by Mobile Phone Radiation / S. A. Meo [et al.] // *J. College of Physicians and Surgeons Pakistan.* – 2011. – Vol. 21, N 6. – P. 262–265.
15. 2,45-GHz microwave irradiation adversely affects reproductive function in male mouse, *Mus musculus* by inducing oxidative and nitrosative stress // S. Shahin [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2014. – Vol. 48, N 5. – P. 511–525.
16. Aveda, M. A. Effects of exposure to radiation male rat reproductive system / M. A. Aveda, R. M. Usikalu, F. O. Awobajo // *Int. J. Curr. Res.* – 2011. – Vol. 2, N 1. – P. 120–128.
17. Каверзнева, Т. Т. Медико-биологические основы безопасности жизнедеятельности: учеб. пособие / Т. Т. Каверзнева, Н. А. Чумаков, О. В. Смирнова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2013. – С. 194–238.

Поступила в редакцию 04.05.2016

УДК 616.36 -002+547.93

*Е. Б. БЕЛОНОВСКАЯ¹, О. Я. ЛУКИВСКАЯ¹, Е. Е. НАРУТА¹, С. Н. КИРКО¹, В. З. АБАКУМОВ²,
И. А. КУЗЬМИЦКАЯ¹, В. У. БУКО¹*

**ГЕПАТОПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ C₂₃-ПРОИЗВОДНОГО
УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
НЕАЛКОГОЛЬНОМ СТЕАТОГЕПАТИТЕ У КРЫС**

¹*Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси,
Гродно, Беларусь, e-mail: ms.belonovskaya@yandex.ru*
²*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь*

Исследована эффективность применения производного урсодезоксихолевой кислоты (C₂₃-гомолог УДХК в дозе 38,6 мг/кг, эквимоларной дозе УДХК 40 мг/кг) при экспериментальном неалкогольном стеатогепатите (НАСГ) у крыс. Результаты исследования показали, что C₂₃-гомолог УДХК наравне с УДХК оказывает выраженный гепатопротективный эффект при лечении НАСГ, проявляя противовоспалительную активность и умеренное липидснижающее действие. В отличие от исходного соединения, производное УДХК обладает более выраженным антиоксидантным потенциалом.

Ключевые слова: неалкогольный стеатогепатит, урсодезоксихолевая кислота, производное, печень.

*E. B. BELONOVSKAYA¹, O. Y. LUKIVSKAYA¹, E. E. NARUTA¹, S. N. KIRKO¹, V. Z. ABAKUMOV²,
I. A. KUZMITSKAYA¹, V. U. BUKO¹*

**HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF THE C₂₃-DERIVATIVE OF THE URSODEOXYCHOLIC ACID
IN EXPERIMENTAL NONALCOHOLIC STEATONEPATITIS OF RATS**

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Belarus, e-mail: ms.belonovskaya@yandex.ru*
²*Grodno State Medical University, Grodno, Belarus*

The effects of the C₂₃-derivative of ursodeoxycholic acid (nor-UDCA) in rats with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) were studied. NASH was induced by the feeding of a liquid high-fat diet of Lieber-DeCarli for 16 weeks. Rats were daily administered with the derivative of UDCA in a dose of 38.6 mg/kg (equimolar to 40 mg/kg UDCA) by oral gavage for the last 4 weeks. Our study demonstrated that the treatment with nor-UDCA improved the liver steatosis and decreased the inflammation and the NASH-induced lipid peroxidation. The obtained experimental data allow us to make a conclusion that the derivative of UDCA in the same extent with UDCA possessed hepatoprotective properties but it has a more antioxidant potential than a mother compound.

Keywords: nonalcoholic steatohepatitis, ursodeoxycholic acid, derivative, liver.

Введение. Малоактивный образ жизни и чрезмерное потребление высококалорийных рафинированных продуктов в большинстве случаев приводят к развитию неалкогольного стеатогепатита (НАСГ). В настоящее время НАСГ рассматривается как самостоятельная нозологическая форма хронического диффузного заболевания печени и характеризуется наличием стеатоза и перипортального либо лобулярного воспаления. Развитие гепатита на фоне стеатоза обусловлено нарушением окислительных процессов с образованием избыточного количества продуктов перекисного окисления (ПОЛ), митохондриальной дисфункцией, стрессом эндоплазматического ретикулума, гиперсекрецией провоспалительных цитокинов и бактериальной эндотоксемией [1].

В связи с широкой распространенностью данной патологии, ассоциацией ее с нарушениями липидного и углеводного обмена (ожирение, дислипидемия, сахарный диабет второго типа),

а также с прогрессирующим течением заболевания до развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы актуальность терапии приобретает все большую значимость. Поскольку основные механизмы патогенеза заболевания сложны и до конца не изучены, терапия является эмпирической и ограничена рассмотрением патологических состояний, связанных с развитием НАСГ. Важное место в лечении этой патологии отводится цитопротекторам. Лечебная эффективность при НАСГ выявлена у препаратов урсодезоксихолевой кислоты (УДХК), широко применяемой как классический гепатопротектор в терапии холестатических заболеваний печени. Согласно литературным данным, применение УДХК при НАСГ в дозе 10–15 мг/кг/сут в течение 6 мес. и более сопровождается значительным улучшением показателей печеночных тестов, липидного обмена, уменьшением явлений стеатоза печени [2]. Вместе с тем часть исследователей скептически оценивают эффективность УДХК в терапии стеатогепатита в отношении улучшения прогноза заболевания и предотвращения развития терминальных стадий болезни. На сегодняшний день большой интерес привлекают полусинтетические производные УДХК. Принимая во внимание многообразие механизмов действия УДХК, предполагается наличие гепатопротективного потенциала и у ее гомологов. В настоящее время пристальное внимание исследователей уделяется короткоцепочечному C₂₃-гомологу УДХК (нор-УДХК). Последние проведенные исследования на животных показали его уникальные свойства повышать гидрофильность и снижать цитотоксичность желчных кислот при склерозирующем холангите и фиброзе печени у Mdr2 (-/-) мышей [3]. В нашей лаборатории продемонстрированы выраженные противофиброзные свойства этого соединения [4].

Цель настоящего исследования – изучить эффективность применения C₂₃-гомолога УДХК при неалкогольном стеатогепатите у крыс, используя в качестве препарата сравнения УДХК.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проведены на крысах-самках линии Wistar с массой тела к началу эксперимента 180–200 г, с соблюдением принципов гуманного отношения к лабораторным животным. Для индуцирования НАСГ животных содержали на жидкой высокожировой диете (ВЖД), приготовленной на основе базовой (стандартной) диеты Lieber-DeCarli производства Ssniff Specialdiaten GmbH (Германия) с добавлением 40 г кукурузного масла согласно оригинальной прописи авторов в течение 16 недель, ad libitum [5]. Содержание жирового компонента в диете составляло 71 %, углеводов – 11, белков – 18 % от общей калорийности рациона. Контрольные животные получали стандартную диету без добавления масла. Препараты УДХК и C₂₃-производное УДХК произведены фирмой Prodotti Alimentari (Италия). Все животные, участвующие в опыте, были разделены на следующие группы: группа 1 – контрольная (*n* = 8); группа 2 – животные, получавшие ВЖД; животные групп 3, 4 получали на фоне ВЖД: группа 3 – УДХК в дозе 40 мг/кг/сут; группа 4 – C₂₃-гомолог УДХК в дозе 38,6 мг/кг/сут (доза эквивалентна дозе УДХК 40 мг/кг). В последние 4 недели эксперимента оба препарата ежедневно вводили внутривенно, на 0,8 %-ном водном растворе гидроксиметилпропилцеллюлозы. Спустя 16 недель от начала эксперимента животные были подвергнуты декапитации под эфирным наркозом. Материалом для исследования являлась кровь, взятая натощак из шейной вены, и ткань печени. Забор материала производили в утреннее время с 9 до 10 ч. Сыворотку крови, полученную путем центрифугирования при 3000 об/мин, использовали для определения биохимических показателей. Образцы ткани печени замораживали в жидком азоте для дальнейшего определения триглицеридов (ТГ) печени.

Для проведения гистологического исследования с помощью световой микроскопии часть образцов центральной части правой доли печени фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина, часть замораживали в жидком азоте. Материал после фиксации проводили по стандартной методике в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Приготовленные в криостате срезы толщиной 15 мкм окрашивали суданом черным Б. Изучение микропрепаратов, морфометрию и микрофотосъемку выполняли на микроскопе Olympus CX-41, оснащенный цифровой фотокамерой Olympus C-5660 (Япония). Определение относительной площади суданофильных областей проводили на базе компьютерной программы Bioscan (Минск, Беларусь) при 400-кратном увеличении на захваченном кадре в реальном масштабе и относили ее к общей площади кадра.

Активность сывороточных аланин- (АлАТ) и аспартатаминотрансфераз (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), содержание ТГ в печени определяли с помощью наборов фирмы Lachema (Чехия) согласно прилагаемым инструкциям. Содержание альфа-фактора некроза опухоли (α -ФНО) определяли с помощью тест-системы Quantikine (R&D Systems GmbH, Германия) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Оценку антиоксидантного статуса клеток печени и интенсивности процессов ПОЛ проводили, регистрируя концентрацию субстратов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), определяемых спектрометрически по методу Stocks and Dormandy [6]. Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) в гомогенате печени определяли по методу Ellman [7]. Активность глутатионпероксидазы измеряли по методу [8], глутатионредуктазы – по методу [9] в модификации С. А. Хотильченко. Активность каталазы определяли спектрометрически. Уровень активных форм кислорода (АФК) оценивали методом измерения интенсивности хемилюминесценции в присутствии люминола (Люм-ХЛ) и люцигенина (Люц-ХЛ) [10].

Экспериментальные данные представлены в виде среднего арифметического (M) \pm стандартная ошибка среднего арифметического (SEM) и проанализированы с расчетом t -критерия Стьюдента. Уровень доверительной вероятности $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимый.

Результаты и их обсуждение. Моделирование НАСГ сопровождалось значительными изменениями гистологической структуры печени экспериментальных животных по сравнению с таковой в контрольной группе. Потребление ВЖД в течение 16 недель приводило к развитию мелкокапельной жировой дистрофии гепатоцитов, клетки с крупными каплями жира располагались в перипортальной области. Обнаруживались очаги некробиоза гепатоцитов с умеренной внутريدольковой лимфоцитарной инфильтрацией паренхимы печени (рис. 1, б). Гистохимиче-

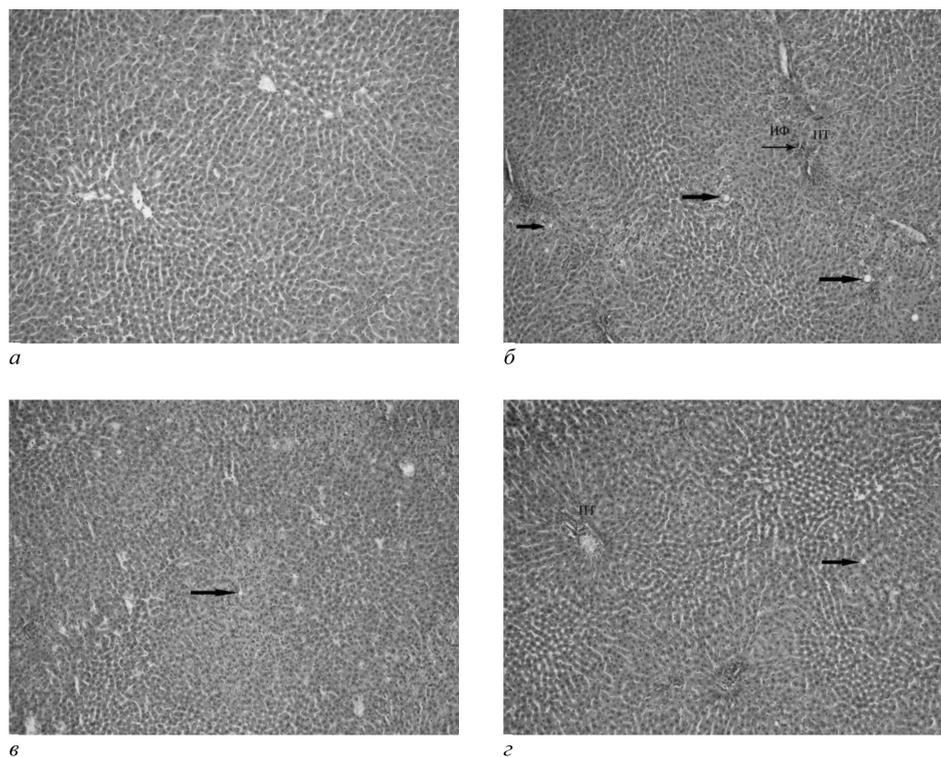


Рис. 1. Гистологическое строение печени крыс с НАСГ, получавших УДХК и ее производное: а – в контрольной группе; б – у животных, потреблявших ВЖД (мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов с наличием группы клеток с крупными включениями жира (указано стрелками) и лимфогистиоцитарная инфильтрация портальных трактов; в – у крыс, получавших УДХК; г – у животных, потреблявших C_{23} -гомолог УДХК (снижение признаков стеатоза и воспаления: встречаются единичные гепатоциты с крупными жировыми включениями (указано стрелками), портальные тракты интактны). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

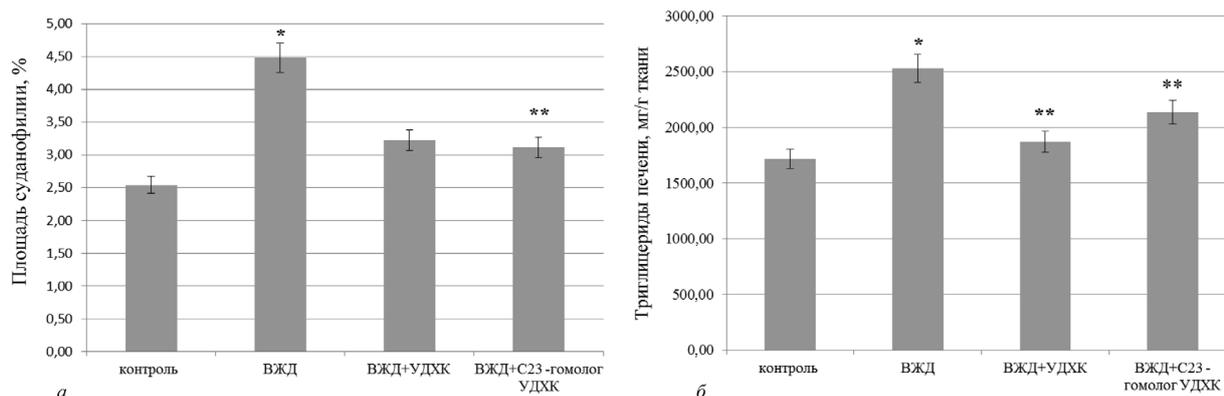


Рис. 2. Относительная площадь (%) суданофильного окрашивания гистологических срезов печени крыс с НАСГ, получавших УДХК и ее производное (а), и содержание триглицеридов (мг/г ткани) в печени (б). Статистическая значимость различий ($p < 0,05$): * – по сравнению с контролем; ** – по сравнению с группой животных, получавших ВЖД

ская окраска препаратов, проводимая с целью оценки степени аккумуляции липидов в печени, выявляла достоверное увеличение относительной площади суданофильного окрашивания срезов печени в 1,8 раза по сравнению с контролем (рис. 2, а). Доказательством развития стеатоза печени являлось и увеличение содержания ТГ в печени, превышающее контрольные значения в 1,5 раза (рис. 2, б). Введение животным УДХК и C_{23} -гомолога УДХК способствовало снижению стеатоза и воспалительных явлений в печени. При этом оба препарата уменьшали относительную площадь суданофильных областей, достоверно снижали уровень ТГ в печени. Как видно из табл. 1, длительное потребление диеты вызывало повышение активности маркерных ферментов (АлАТ, ЩФ, ГГТП) в сыворотке крови. Введение УДХК и C_{23} -гомолога УДХК в одинаковой степени статистически достоверно приводило к нормализации АлАТ, ГГТП, не оказывая при этом существенного влияния на ферментативную активность ЩФ. Уровень АсАТ практически не изменялся ни в одной из опытных групп. Развитие воспалительных явлений в печени при скармливании ВЖД подтверждалось повышением концентрации основного провоспалительного цитокина, α -ФНО, в 4 раза по сравнению с таковой в контрольной группе. Введение УДХК и ее производного достоверно снижало содержание α -ФНО в сыворотке крови (в 2,5 и 1,6 раза соответственно).

Т а б л и ц а 1. Активность маркерных ферментов и концентрация α -ФНО в сыворотке крови

Показатель	Контроль	ВЖД	ВЖД + УДХК	ВЖД + C_{23} -гомолог УДХК
АлАТ, МЕ/л	0,501 ± 0,0246	0,583 ± 0,0390 ^a	0,465 ± 0,040 ^b	0,504 ± 0,0237 ^b
АсАТ, МЕ/л	0,876 ± 0,0527	0,963 ± 0,0454	0,880 ± 0,0546	0,969 ± 0,0320
ЩФ, МЕ/л	214 ± 8,30	266 ± 10,87 ^a	257 ± 11,95 ^a	256 ± 7,58 ^a
ГГТП, МЕ/л	4,645 ± 0,2738	6,350 ± 0,320 ^a	4,550 ± 0,2047 ^b	4,714 ± 0,3002 ^b
α -ФНО, пг/мл	0,90 ± 0,070	3,63 ± 0,34 ^a	1,44 ± 0,21 ^{ab}	2,21 ± 0,58 ^{ab}

П р и м е ч а н и е. Статистическая достоверность различий ($p < 0,05$) здесь и в табл. 2: ^a – по отношению к контролю; ^b – по отношению к группе, находившейся на вскармливании ВЖД; ^c – по отношению к группе, получавшей УДХК.

Повреждение печени сопровождалось активацией процессов свободнорадикального окисления и снижением антиоксидантной защиты, что проявлялось повышением наработки свободных кислородных радикалов, оцениваемой по интенсивности хемилюминесценции, усиленной люминолом и люцигенином, увеличением концентрации ТБКРС на 44 %, снижением уровня GSH на 43 %, а также падением активности глутатионзависимых ферментов (табл. 2). Результаты исследований показали, что применение УДХК и C_{23} -гомолога УДХК способствует достоверному снижению наработки супероксиданиона, оцениваемой по хемилюминесценции с люминолом и

Т а б л и ц а 2. Влияние УДХК и производного на свободнорадикальные процессы в печени крыс

Показатель	Контроль	ВЖД	ВЖД + УДХК	ВЖД + C ₂₃ -гомолог УДХК
ТБКРС, мкмоль/мг белка	41,2 ± 3,14	59,3 ± 4,55	40,8 ± 5,23 ^b	34,9 ± 3,36 ^b
GSH, мкмоль/мг белка	1,74 ± 0,09	0,99 ± 0,06 ^a	0,90 ± 0,09 ^a	1,07 ± 0,12 ^a
Глутатионпероксидаза, мкмоль/с/мг белка	1,64 ± 0,06	1,22 ± 0,06 ^a	1,33 ± 0,04 ^a	1,81 ± 0,08 ^{bc}
Глутатионредуктаза, мкмоль/с/мг белка	14,17 ± 0,47	9,59 ± 0,41 ^a	11,95 ± 0,49 ^{a,b}	13,08 ± 0,44 ^b
Каталаза, мкмоль/мг белка в 1 мин	167,8 ± 12,76	156,2 ± 9,84	232,5 ± 14,24 ^{ab}	402,9 ± 40,54 ^{abc}
Люм-ХМ, с. р. м/мг белка в 1 мин, ×10 ³	6,0 ± 0,57	9,7 ± 0,65 ^a	7,3 ± 0,70 ^b	6,1 ± 0,83 ^b
Люц-ХМ, с. р. м/мг белка в 1 мин, ×10 ⁵	4,2 ± 0,32	6,3 ± 0,28 ^a	5,5 ± 0,46	5,4 ± 0,28 ^b

продукции других АФК (гидроксильного радикала, синглетного кислорода и др.), на что указывает интенсивность хемилюминесценции, усиленной люцигенином [11]. Оба препарата уменьшали концентрацию ТБКРС в печени, причем наблюдалось небольшое преимущество гомолога перед монопрепаратом без статистической достоверности. Ни УДХК, ни его производное не оказывали значимого влияния на уровень GSH. Достоверная активация каталазы под влиянием УДХК (в 1,6 раза) была, однако, значительно ниже (в 2,6 раза), чем при введении C₂₃-гомолога, действие которого на активность этого фермента было особенно выраженным (табл. 2).

Как свидетельствуют представленные данные, длительное потребление животными жидкой ВЖД приводило к развитию НАСГ с характерными для этой патологии патогистологическими изменениями в печени, представленными микровезикулярным стеатозом и воспалением паренхимы. Результаты гистологического исследования сопровождались сдвигами биохимических показателей: скармливание ВЖД способствовало увеличению активности маркерных ферментов сыворотки крови (АлАТ, ЩФ, ГГТП), повышению содержания ТГ в печени, увеличению концентрации сывороточного α-ФНО. Анализ показателей процессов свободнорадикального окисления показал интенсификацию процессов ПОЛ и снижение антиоксидантной защиты, о чем свидетельствовало увеличение ТБКРС и падение активностей каталазы и ферментов глутатиона. Результаты проведенного исследования показали, что C₂₃-гомолог УДХК, как и исходное соединение, в условиях НАСГ оказывает гепатозащитное действие. Оба препарата проявляли схожие терапевтические эффекты: в одинаковой степени ослабляли выраженность патологических изменений в печени, уменьшали проявления цитолиза, снижали содержание ТГ в печени и уровень α-ФНО в сыворотке крови. Изученное нами ранее влияние нор-УДХК на развитие экспериментального алкогольного стеатогепатита у крыс показало, что нор-УДХК, в отличие от УДХК, более эффективна в предупреждении стеатоза печени [12]. В настоящем эксперименте производное УДХК, в отличие от УДХК, обладало более выраженным антиоксидантным потенциалом. Результаты исследования показали, что C₂₃-гомолог УДХК в большей степени способствует защите клеточных мембран гепатоцитов от повреждения АФК и установлению про/антиоксидантного равновесия, о чем свидетельствует значительное снижение уровня ТБКРС, повышение активности ферментов антиоксидантной защиты, угнетение наработки свободных кислородных радикалов, оцениваемое по свечению хемилюминесцентных зондов.

Согласно литературным данным, нор-УДХК в большей степени, чем УДХК ослаблял развитие НАСГ у NEMO (Δhera) мышей с отсутствием гепатоцит-специфического ядерного фактора NEMO/NF-κB [13]. Предполагают, что C₂₃-гомолог УДХК подавляет липогенез и нормализует обмен желчных кислот.

C₂₃-гомолог УДХК является производным УДХК с укороченной боковой цепью из-за отсутствия одной метильной группы в химической структуре, в результате чего наблюдается относительная устойчивость соединения к конъюгации с таурином и глицином по сравнению с УДХК [14]. Исследуемое производное УДХК обладает большей гидрофильностью, чем УДХК, а следовательно, меньшей токсичностью, что позволяет использовать его в течение более длительного периода [15]. Последние исследования показали, что C₂₃-гомолог УДХК проявляет антифи-

бронные, антипролиферативные, противовоспалительные свойства в экспериментальных моделях склерозирующего холангита и биллиарного фиброза печени у Mdr2 (-/-) мышей [3], а также фиброза печени, вызванного инфицированием *S. mansoni* [16]. Подтверждением противофиброзного действия нор-УДХК явились результаты, полученные в ходе проведенных нами недавних исследований [4]. Введение C₂₃-гомолога УДХК крысам на двух моделях фиброза печени, индуцированного тиоацетамидом, оказывало как профилактический эффект, тормозя развитие фиброза печени, так и выраженное терапевтическое действие, проявляющееся в снижении интенсивности фиброза после отмены токсического агента. Противофиброзный эффект C₂₃-гомолога УДХК был значительно сильнее по сравнению с УДХК, на что указывали более выраженное снижение оксипролина как «золотого маркера» и сывороточных маркеров фиброза печени.

Заключение. Приведенные данные позволяют заключить, что C₂₃-гомолог УДХК в дозе 38,6 мг/кг не уступает УДХК по гепатопротективному действию у крыс с НАСТ, проявляя противовоспалительную активность и умеренное липидснижающее действие. В отличие от исходного соединения, изучаемое производное обладает более выраженным антиоксидантным потенциалом, что делает перспективным его использование при длительном введении.

Список использованной литературы

1. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference / V. Ratziu [et al.] // J. Hepatol. – 2010. – Vol. 53, N 2. – P. 372–384.
2. Serum markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Correlation to morphology and effect of therapy / J. Holoman [et al.] // J. Hepatol. – 2000. – Vol. 32. – P. 210.
3. Side chain structure determines unique physiologic and therapeutic properties of norursodeoxycholic acid in Mdr2-/- mice / E. Halilbasic [et al.] // J. Hepatol. – 2009. – Vol. 49. – P. 1972–1981.
4. Protective effects of norursodeoxycholic acid versus ursodeoxycholic acid on thioacetamide-induced rat liver fibrosis / V. Buko [et al.] // J. Clin. Exp. Hepatol. – 2014. – Vol. 4, N 4. – P. 293–301.
5. Model of nonalcoholic steatohepatitis / C. S. Lieber [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 2004. – Vol. 79. – P. 502–509.
6. The autooxidation of human red cells lipids induced by hydrogen peroxide / J. Stocks [et al.] // Br. J. Haematol. – 1971. – Vol. 20, N 1. – P. 95–111.
7. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G. L. Ellman [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 1961. – Vol. 7. – P. 88–95.
8. A sensitive microassay for the determination of glutathione peroxidase activity. Application to human blood platelets / J. I. R. Martinez [et al.] // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 98. – P. 154–159.
9. Effect of riboflavin depletion and repletion on the erythrocyte glutathione reductase in the rat / J. A. Tilbotson [et al.] // J. Nutrition. – 1971. – Vol. 101. – P. 1459–1466.
10. The amplified chemiluminescence test to characterize antirheumatic drugs as oxygen radical scavengers / R. Müller-Peddinhaus [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 1987. – Vol. 36. – P. 1125–1132.
11. Nonsuperoxide lucigenin-enhanced chemiluminescence from phospholipids and human saphenous veins / D. A. Barber [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1995. – Vol. 18, N 3. – P. 565–569.
12. Профилактическое применение новых производных урсодезоксихолевой кислоты при экспериментальном алкогольном стеатогепатите / Е. Б. Белоновская [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 2013. – Т. 76, № 1. – С. 25–29.
13. Nor-ursodeoxycholic acid reverses hepatocyte-specific nemo-dependent steatohepatitis / N. Beraza [et al.] // Gut. – 2011. – Vol. 60. – P. 387–396.
14. Novel biotransformation and physiological properties of norursodeoxycholic acid in humans / A. F. Hofmann [et al.] // Hepatology. – 2005. – Vol. 42. – P. 1391–1398.
15. Differing effect of nor-ursodeoxycholic and ursodeoxycholic acid on hepatic histology and bile acid metabolism in rabbit / B. I. Cohen [et al.] // Gastroenterology. – 1986. – Vol. 91. – P. 189–197.
16. 24-nor-ursodeoxycholic acid as novel therapeutic strategy for inflammation-induced liver fibrosis in a murine model of *Shistosoma mansoni* infection / M. Sombetzky [et al.] // J. Hepatol. – 2008. – Vol. 48, N 2. – P. 21–22.

Поступила в редакцию 23.06.2016

УДК 616.89-008.441.13:918.33

П. А. СУХОДОЛЬСКИЙ, Д. Н. ПУХОВ, С. М. ЗИМАТКИН

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В МОЗЖЕЧКЕ КРЫС ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОЙ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

*Гродненский государственный медицинский университет,
Гродно, Беларусь, e-mail: paul.sukhadolski@gmail.com*

Аntenатальная алкоголизация вызывает разнообразные структурные нарушения развития коры мозжечка, большинство из которых сохраняется на протяжении длительного времени. Наиболее выраженные изменения (увеличение толщины слоев коры мозжечка, уменьшение количества клеток Пуркинье, а также изменение их хроматофилии в сторону преобладания патологических форм клеток при снижении количества нормальных форм) наблюдаются в период поздней стадии дифференцировки и фолциации мозжечка – на 20-е сутки постнатального развития. К 45-м суткам постнатального развития морфологическая картина мозжечка отчасти нормализуется, при этом уменьшаются размеры перикарионов клеток Пуркинье и сохраняется увеличенная толщина коры.

Ключевые слова: мозжечок, развитие, алкоголь, алкогольный синдром плода.

P. A. SUKHADOLSKI, D. N. PUKHAU, S. M. ZIMATKIN

DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE RAT CEREBELLUM AFTER CHRONIC PRENATAL ALCOHOL EXPOSURE

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus, e-mail: paul.sukhadolski@gmail.com

Prenatal exposure to ethanol leads to various structural abnormalities in the developing cerebellum, some of them remain for a long time. The most substantial changes, such as cortex layers thickening, reduction of Purkinje cell count and changes of the cell chromatophilia, take place during the period of differentiation of Purkinje cells and foliation of cerebellum – on the 20th day of postnatal life. To the age of 45 days the histological picture tends to normalize, though some parameters remain abnormal: the area of Purkinje cells decreases and the thickness of the cerebellar cortex remains increased.

Keywords: cerebellum, development, alcohol, fetal alcohol syndrome.

Введение. Губительное воздействие этанола на плод известно давно. В 1968 г. для описания симптомокомплекса тяжелых нарушений, вызванных пренатальной алкоголизацией, был предложен термин «фетальный алкогольный синдром» (FAS) [1, 2]. Дальнейшее изучение этой проблемы позволило более детально изучить возникающие нарушения и выявить более широкий спектр нарушений – «спектр фетальных нарушений алкогольной природы» (FASD), включающий анатомические, поведенческие, психические и неврологические нарушения разной степени тяжести [3]. Как известно, антенатальное воздействие алкоголя по большей части направлено на развивающуюся ЦНС, нарушая формирование высшей нервной деятельности. Так, лица с FASD, как правило, отстают в развитии, у них нарушены социальные аспекты поведения, снижены математические навыки, нарушена координация движений [4–8].

Единый механизм антенатального действия алкоголя на ЦНС пока еще не сформулирован, так как, скорее всего, воздействие осуществляется комплексно, вовлекая многие механизмы и метаболические пути развивающейся ткани. Так, биохимические и иммуногистохимические исследования выявили нарушения нейротрофики [9], окислительный стресс в результате действия алкоголя и его метаболитов [10, 11], нарушение миграции и созревания нервных клеток [12–14], повреждения генной регуляции [15–17], изменения в нейротрансмиссии и медиаторной реактивности [18–22].

© Суходольский П. А., Пухов Д. Н., Зиматкин С. М., 2016

Влияние пренатальной и ранней постнатальной алкоголизации на развитие мозжечка в ранние сроки изучалось многими авторами [23–27], однако сведения о более поздних сроках, а также о динамике возникающих изменений отрывочны и противоречивы [12, 28, 29].

Цель настоящего исследования – изучение динамики постнатального морфогенеза мозжечка крыс в норме и после антенатальной алкоголизации.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проводили на беспородных белых крысах и их потомстве. Все действия над животными были регламентированы на заседании комиссии по биомедицинской этике УО ГрГМУ (протокол протокол № 7 от 05.12.13) и соответствовали положениям, предусмотренным Европейской конвенцией и существующим проектом Закона Республики Беларусь «Об обращении с животными». Для опытов было отобрано 16 крыс-самок массой 200 ± 20 г. Оплодотворение производили естественным путем, подсаживая самца в клетку с самками. Выявление беременности определяли по наличию сперматозоидов в вагинальном мазке. Беременные самки были разделены на две группы: «Контроль» и «Алкоголь». Все животные содержались в стандартных условиях, в индивидуальных клетках, имели свободный доступ к сухому корму, обогащенному творогом, и питью. Животные группы «Алкоголь» в качестве единственного источника питья получали 15 %-ный раствор этанола в питьевой воде на протяжении всей беременности. Среднее потребление этанола на протяжении беременности составило 3,6 г/кг/сут, что, по версии ВОЗ [30], превышает границу «тяжелое пьянство» для человека и является достаточной дозой для проявления нарушений плода [31–33].

Потомство крыс обеих групп выводили из эксперимента путем мгновенной декапитации в возрасте 5, 10, 20 и 45 дней после рождения (далее – ДПР). Образцы мозжечка фиксировали в жидкости Карнуа, дегидратировали и заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля, и микроскопировали дольки IV–V паравермальной области мозжечка. Анализировали толщину коры, молекулярного и внутреннего зернистого слоя данной области, количество клеток Пуркинье на единицу длины извилин, а также их площадь. Для определения развития белого вещества в дольках IV–V оценивали его площадь относительно общей площади долек. Популяцию клеток Пуркинье определяли количественно, а также по степени хроматофилии перикарионов: нормохромные, гипохромные, гиперхромные и гиперхромные сморщенные нейроны [34, 35].

Статистический анализ полученных цифровых данных проводили в программе Statistica, результаты представлены в виде медианы (нижняя квартиль; верхняя квартиль), достоверность различий по *U*-критерию Манна–Уитни принималась при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. *Толщина коры и развитие белого вещества.* На протяжении всего исследуемого периода толщина коры мозжечка у животных обеих групп закономерно увеличивалась. У животных контрольной группы максимальные темпы прироста толщины коры наблюдались в период с 5-х по 20-е сутки постнатального развития, что совпадает с периодом усиленной пролиферацией корзинчатых, звездчатых клеток и клеток-зерен, ростом дендритов клеток Пуркинье и развитием глии [36]. В период с 10-х по 20-е сутки активно увеличивалась толщина молекулярного слоя, что связано с активным дендритогенезом клеток Пуркинье. Относительное содержание белого вещества в дольках мозжечка в период с 10-х по 20-е сутки уменьшалось во всех группах, а в период с 20-х по 45-е сутки имела место тенденция к увеличению их количества. У животных группы «Алкоголь» наблюдали сходную картину, однако возрастные изменения проявлялись более выражено. Так, толщина коры мозжечка в группе «Алкоголь» в период с 10-х по 45-е сутки была достоверно выше, чем в контроле. Аналогичная тенденция выявлена в молекулярном и внутреннем зернистом слоях, толщина которых в группе «Алкоголь» была достоверно выше, чем в контроле (табл. 1). Увеличение толщины коры мозжечка после антенатальной алкоголизации можно объяснить нарушением регуляции дендритогенеза из-за алкогольного поражения клеток Гольджи–Бергмана, осуществляющих контроль и ограничение роста дендритов [12]. Развитие же белого вещества под действием алкоголя было достоверно угнетено лишь на 10-е сутки и составило 8 % против 18 % в контроле. Анализ развития белого вещества на 5-е сутки не проводили по причине недостаточного развития долек мозжечка.

Т а б л и ц а 1. Толщина коры и развитие белого вещества мозжечка крыс после антенатальной алкоголизации

Показатель		5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки
Толщина коры, мкм	Контроль	78,6 (72,4; 87,7)	137,6 (109,8; 176,2)	226,2 (200,7; 252,3)	275,9 (259,9; 294,8)
	Алкоголь	84,8 (74,3; 97,5)	176,8* (153,2; 195,8)	261,4* (225,5; 315,2)	302,0* (270,7; 333,1)
Молекулярный слой, мкм	Контроль	15,1 (11,8; 17,6)	22,1 (18,5; 37,9)	88,8 (81,1; 117,6)	132,2 (121,4; 144,1)
	Алкоголь	14,5 (11,7; 16,6)	28,7* (24,2; 32,6)	105,4* (97,7; 117,6)	146,7* (132,4; 176,2)
Внутренний зернистый слой, мкм	Контроль	23,4 (20,4; 27,8)	43,9 (30,9; 99,5)	111,8 (100,8; 144,0)	122,8 (110,2; 135,2)
	Алкоголь	23,4 (21,4; 29,6)	78,5* (65,2; 92,7)	135,7 (108,1; 166,3)	132,0* (118,3; 162,7)
Развитие белого вещества, %	Контроль	Нет данных	18,0 (17; 24)	4,8 (4,2; 5,4)	5,8 (5,6; 6,3)
	Алкоголь	Нет данных	8,0* (6; 8)	4,5 (3,9; 5,0)	6,4 (5,9; 7,2)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Клетки Пуркинье. Развитие клеток Пуркинье у крысы продолжается преимущественно с 14-х суток внутриутробного и до 15-х суток постнатального периода [36]. В этом временном промежутке можно выделить несколько последовательных этапов: с 13-х суток до рождения происходят пролиферация и нейрогенез, формирование нейронов из нейробластов, а с рождения до 9–10-х суток наблюдается интенсивная дифференцировка клеток Пуркинье и дендритогенез, связанный с фоллиацией (формированием слоев коры мозжечка) и развитием клеток-зерен [36, 37]. До окончания процесса фоллиации изучение клеток Пуркинье связано с определенными сложностями, а именно с отсутствием выраженного слоя Пуркинье и нехарактерной морфологией перикарионов нейронов. По этим причинам исследования популяции и морфометрии клеток Пуркинье на 5-е сутки постнатального развития нами не проводились.

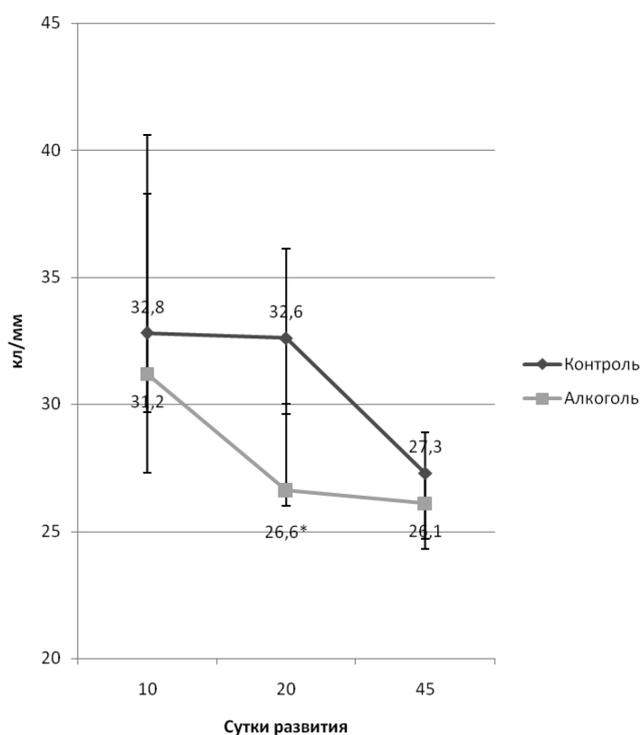


Рис. 1. Изменение количества клеток Пуркинье на миллиметр длины извилины. * – изменения достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

На протяжении изучаемого периода количество клеток Пуркинье на единице длины извилины в обеих группах снижалось, что объясняется быстрым развитием нейроглии, ростом дендритов, увеличением объема и площади поверхности мозжечка при относительно стабильном общем числе нейронов. Однако плотность расположения клеток в группе «Алкоголь» снижалась гораздо более резко, что позволяет предположить о наличии такого дополнительного фактора, как гибель клеток (рис. 1). Также следует отметить, что в коре

мозжечка после антенатальной алкоголизации на всех сроках развития наблюдались так называемые «области выпадения» – участки коры с сильно сниженным, вплоть до полного отсутствия, количеством клеток Пуркинье (рис. 2).

В период с 20-х по 45-е сутки скорость снижения плотности клеток группе «Алкоголь» снижалась, в то время как в группе «Контроль», наоборот, росла, что, в конечном итоге, приводило к примерно равным показателям плотности расположения клеток на 45-е сутки. Предположительно это связано, с одной стороны, с замедлением роста мозжечка [38, 39], а с другой стороны – со снижением темпов гибели клеток в период с 20-х по 45-е сутки в группе «Алкоголь». В пользу этого предположения говорит распределение клеток Пуркинье по степени хроматофилии цитоплазмы. Так, в период с 20-х по 45-е сутки в группе «Алкоголь» отмечали снижение количества гиперхромных сморщенных нейронов с 3,2 до 1,1 кл/мм, что совпадало с таковым в группе «Контроль» на 45-е сутки (1,0 кл/мм), в то время как количество нормохромных клеток Пуркинье в группе «Алкоголь» с 10-х по 45-е сутки сохранялось на одном уровне.

В целом динамика популяции клеток Пуркинье по хроматофилии цитоплазмы подчинялась определенным закономерностям: на 10-е сутки постнатального развития отмечалась повышенное количество гиперхромных, отличающихся повышенной метаболической активностью и гиперхромных сморщенных нейронов (гибнущих клеток); в последующие сроки превалировали умеренно-активные формы нейронов – нормохромные и гипохромные (табл. 2) [35]. Алкоголь-индуцированные изменения в популяции клеток Пуркинье были наиболее выражены на 20-е сутки постнатального развития и характеризовались снижением доли нормохромных и гипохромных нейронов и повышенной долей гиперхромных сморщенных нейронов.

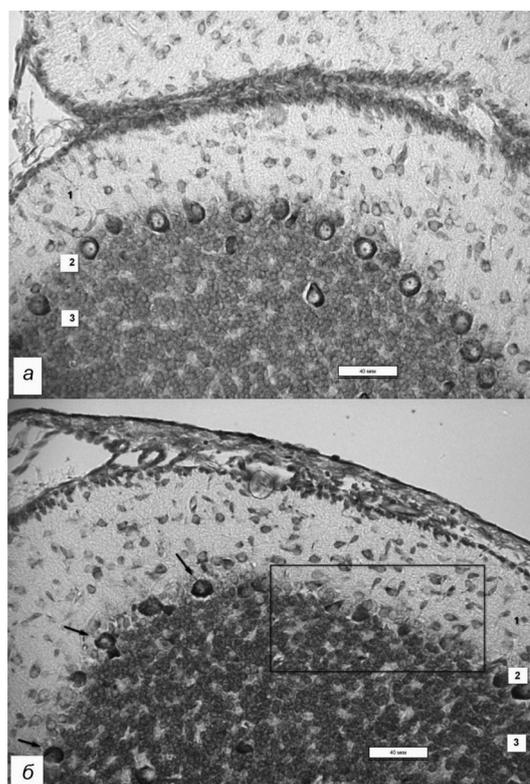


Рис. 2. Участок V долики мозжечка в норме (а) и после антенатальной алкоголизации (б) на 20-е сутки развития: 1 – молекулярный слой, 2 – слой клеток Пуркинье, 3 – зернистый слой. Стрелками указаны гиперхромные сморщенные клетки Пуркинье, рамкой выделена область выпадения клеток Пуркинье. Микрофотография. $\times 20$

Т а б л и ц а 2. Количество клеток Пуркинье разной хроматофильности (на 1 мл длины извилины)

Клетки		10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки
Общее к-во	Контроль	32,8 (29,7; 38,3)	32,6 (29,6; 36,1)	27,3 (24,3; 28,9)
	Алкоголь	31,2 (27,3; 40,6)	26,6* (26,0; 30,0)	26,1 (24,7; 27,2)
Нормохромные	Контроль	15,4 (10,3; 19,9)	23,1 (18,7; 24,0)	19,7 (15,8; 20,2)
	Алкоголь	15,8 (11,4; 18,4)	15,6* (14,2; 16,1)	14,6 (13,0; 15,1)
Гипохромные	Контроль	0 (0; 0)	7,6 (6,5; 8,9)	4,3 (4,1; 4,4)
	Алкоголь	0 (0; 2,8)	5,2* (3,7; 5,3)	4,1 (3,4; 4,8)
Гиперхромные	Контроль	14,0 (13,4; 14,3)	3,0 (2,6; 5,0)	3,8 (3,5; 3,9)
	Алкоголь	14,4 (10,5; 16,6)	4,2 (2,2; 6,6)	5,0 (4,4; 5,6)
Сморщенные	Контроль	3,6 (0,9; 4,3)	0,4 (0,3; 1,1)	1,0 (0,8; 1,4)
	Алкоголь	2,2 (0,5; 4,3)	3,2* (2,0; 3,9)	1,1 (0,7; 3,7)

П р и м е ч а н и е. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

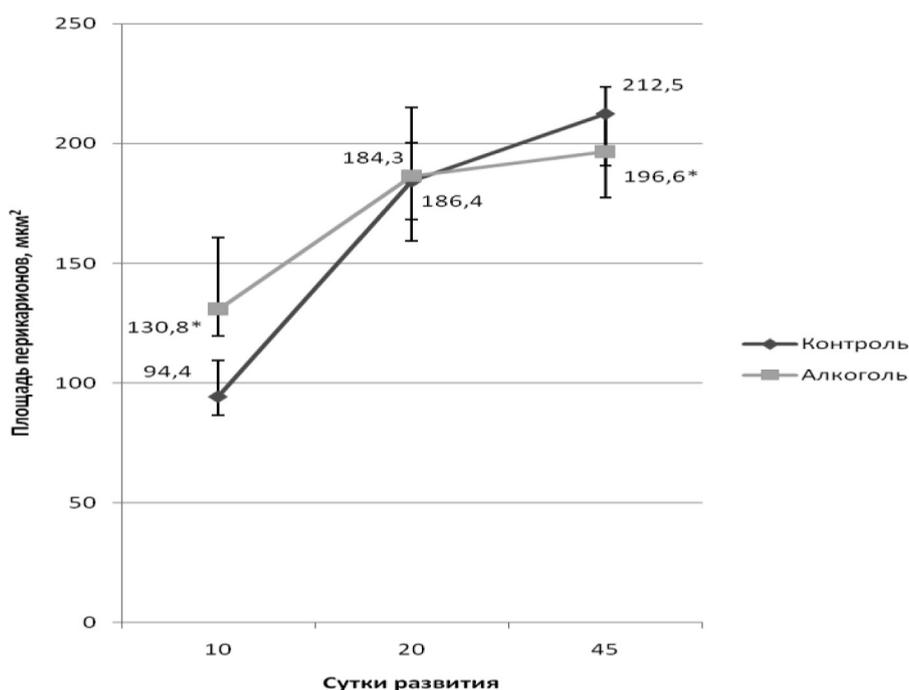


Рис. 3. Динамика площади перикарионов клеток Пуркинье. * – достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$)

Площадь клеток Пуркинье в постнатальном онтогенезе у контрольных животных постепенно увеличивалась (рис. 3). Клетки группы «Алкоголь» первоначально, на 10-е сутки развития, были значительно больше, чем в контрольной группе, однако на 20-е сутки их размеры сравнялись, а на 45-е сутки отмечалось снижение средней площади клеток Пуркинье группы «Алкоголь». Предположительно это связано с токсическим набуханием нейронов в ранние сроки развития [40], а впоследствии – с инволюцией клеток в результате метаболических нарушений [41].

Заключение. Антенатальная алкоголизация вызывает разнообразные структурные нарушения развития коры мозжечка, большинство из которых сохраняется на протяжении длительного времени. Наиболее выраженные изменения (увеличение толщины слоев коры мозжечка, уменьшение количества клеток Пуркинье, а также изменение их хроматофилии в сторону преобладания патологических форм клеток при снижении количества нормальных форм) наблюдаются в период поздней стадии дифференцировки и фоллиации мозжечка – на 20-е сутки постнатального развития. К 45-м суткам постнатального развития морфологическая картина мозжечка отчасти нормализуется, при этом уменьшаются размеры перикарионов клеток Пуркинье и сохраняется увеличенная толщина коры.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект M15M-057).

Список использованной литературы

1. Jones, K. L. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy / K. L. Jones, D. W. Smith // Lancet. – 1973. – Vol. 2. – P. 999–1001.
2. Lemoine, P. Les enfants de parent alcoolique: anomalie observes a propos de 127 cas / P. Lemoine // Ouest Med. – 1968. – Vol. 21. – P. 476–482.
3. Fetal alcohol spectrum disorders / N. Dorrie [et al.] // Eur. Child Adolesc. Psychiatry. – 2014. – Vol. 23 (10). – P. 863–875.
4. Зиматкин, С. М. Алкогольный синдром плода / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь. – Минск: Новое знание, 2014. – 240 с.
5. Fine motor skills in children with prenatal alcohol exposure or fetal alcohol spectrum disorder / R. Doney [et al.] // J. Dev. Behav. Pediatr. – 2014. – Vol. 35 (9). – P. 598–609.
6. Neuropsychological deficits in adolescents with fetal alcohol syndrome: clinical findings / H. Carmichael Olson [et al.] // Alcohol Clin. Exp. Res. – 1998. – Vol. 22. – P. 1998–2012.

7. *Adnams, C. M.* Patterns of cognitive-motor development in children with fetal alcohol syndrome from community in South Africa / C. M. Adnams // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2001. – Vol. 25. – P. 557–562.
8. *Whaley, S. E.* Comparison of the adaptive functioning of children prenatally exposed to alcohol to a nonexposed clinical sample / S. E. Whaley, Mj. O'Connor, B. Gunderson // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2001. – Vol. 25. – P. 1018–1024.
9. Ethanol exposure affects trophic factor activity and responsiveness in chick embryo / M. B. Heaton [et al.] // *Alcohol.* – 1992. – Vol. 9. – P. 161–166.
10. Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: protective effects of voluntary physical exercise / P. S. Brocardo [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2012. – Vol. 62. – P. 16–18.
11. The expression of antioxidant enzymes in a mouse model of fetal alcohol syndrome / N. Drever [et al.] // *J. Obstet. Gynecol.* – 2012. – Vol. 206. – P. 19–22.
12. Abnormalities of cerebellar foliation in rats prenatally exposed to ethanol / H. Sakata-Haga [et al.] // *Acta Neuro-pathol.* – 2001. – Vol. 102 (1). – P. 36–40.
13. Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration / M. P. Aronne [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2011. – Vol. 229. – P. 364–371.
14. Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neurogenesis in the developing murine brain: an *in vitro* and *in vivo* immunohistochemical and ultrastructural study / P. Gressens [et al.] // *Alcohol Alcohol.* – 1992. – Vol. 27. – P. 219–226.
15. Alcohol exposure decreases CREB binding protein expression and histone activity in the developing cerebellum / W. Guo [et al.] // *Plos One.* – 2011. – Vol. 6 (5). – P. e19351.
16. *Balaraman, S.* Opposing actions of ethanol and nicotine on microRNAs are mediated by nicotinic acetylcholine receptors in fetal cerebral cortical-derived neural progenitor cells / S. Balaraman, U. H. Winzer-Serhan, R. C. Miranda // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2012. – Vol. 36 (10). – P. 1669–1677.
17. *Miranda, R. C.* MicroRNA and fetal brain development: implications for ethanol teratology during the second trimester period of neurogenesis / R. C. Miranda // *Front Genet.* – 2012. – Vol. 3. – P. 77.
18. *Marinelli, R. W.* A microdialysis profile of Met-enkephalin release in the rat nucleus accumbens following alcohol administration / R. W. Marinelli // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2005. – Vol. 29. – P. 1821–1828.
19. *Detering, N.* Comparative effect of ethanol and malnutrition on the developing of catecholamine neurons: a long-lasting effects in the hypothalamus / N. Detering, R. Collins, R. L. Hawkins // *J. Neurochem.* – 1981. – Vol. 6. – P. 2094–2096.
20. *Detering, N.* The effect of ethanol on developing catecholamine neurons. Alcohol and aldehyde metabolizing systems / N. Detering, R. Collins, R. L. Hawkins // *IV NY Plenum Press.* – 1980. – P. 721–727.
21. Impact of ethanol on the developing GABAergic system / R. N. Isayama [et al.] // *Anat. Rec. (Hoboken).* – 2009. – Vol. 292. – P. 1922–1939.
22. *Lugo, J. N. Jr.* Perinatal alcohol exposure alters met-enkephalin levels of male and female rats / J. N. Lugo Jr, M. A. Wilson, S. J. Kelly // *Neurotoxicol Teratol.* – 2006. – Vol. 28. – P. 4–41.
23. *Bonthius, D. J.* Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure / D. J. Bonthius, J. R. West // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 1990. – Vol. 14 (1). – P. 107–118.
24. *Cragg, B.* Natural loss of Purkinje cells during development and increased loss with alcohol / B. Cragg, S. Philips // *Brain Res.* – 1985. – Vol. 325 (1–2). – P. 151–160.
25. *Goodlett, C. R.* Binge neonatal alcohol intubations induce dose-dependent loss of Purkinje cells / C. R. Goodlett, A. D. Pearlman, K. R. Lundahl // *Neurotoxicol Teratol.* – 1998. – Vol. 20 (3). – P. 285–292.
26. *Maier, S. E.* Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat / S. E. Maier, J. R. West // *Alcohol.* – 2001. – Vol. 23 (1). – P. 49–57.
27. Neonatal alcohol-induced region-dependent changes in rat brain neurochemistry measured by high-resolution magnetic field resonance spectroscopy / S. K. O'Leary-Moore [et al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2008. – Vol. 32 (10). – P. 1697–1707.
28. Neonatal ethanol produces cerebellar deep nuclear cell loss an correlated disruption of eyeblink conditioning in adult rats / J. T. Green [et al.] // *Brain Res.* – 2002. – Vol. 956 (2). – P. 302–311.
29. Prenatal ethanol exposure and cerebellar development in rats / E. J. Nathaniel [et al.] // *Exp. Neurol.* – 1986. – Vol. 93 (3). – P. 601–609.
30. Global status report on alcohol and health / WHO. – Geneva: WHO, 2014. – 392 p.
31. *Ерохова, З. Н.* Особенности состояния детей раннего возраста с внутриутробной субклинической алкогольной интоксикацией / З. Н. Ерохова, Ю. А. Боженов // *Рос. Вестн. перинатологии и педиатрии.* – 1997. – Т. 42 (1). – С. 70–74.
32. *Москаленко, В. Д.* Дети больных алкоголизмом (возраст от 0 до 18 лет) / В. Д. Москаленко. – М.: Медицина и здравоохранение, 1990. – 68 с.
33. Alcohol and pregnancy: an epidemiologic survey of the alcoholic habits of pregnant women in the metropolitan area of Naples: a three experience / F. Scotto de Tella [et al.] // *Alcologia.* – 1995. – Vol. 7 (2). – P. 119–128.
34. *Калимуллина, Л. Б.* К вопросу о «темных» и «светлых» клетках / Л. Б. Калимуллина // *Морфология.* – 2002. – Т. 122 (4). – С. 75–80.
35. *Einarson, L.* Variation in the basophilia of nerve cells associated with increased cell activity and functional stress / L. Einarson, E. Krogh // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 1955. – Vol. 18. – P. 1–12.

36. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat / S. A. Bayer [et al.] // *Neurotoxicology*. – 1993. – Vol. 14 (1). – P. 83–144.
37. Developing rat Purkinje cells are more vulnerable to alcohol-induced depletion during differentiation than during neurogenesis / B. L. Marcussen [et al.] // *Alcohol*. – 1994. – Vol. 11 (2). – P. 147–156.
38. Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol / S. K. Clarren [et al.] // *J. Pediatr.* – 1978. – Vol. 92. – P. 64–67.
39. *Clarren, S. K.* Neuropathology and fetal alcohol syndrome / S. K. Clarren // *Alcohol and Brain Development* / ed.: J. R. West. – New York: Oxford University Press, 1986. – P. 158–166.
40. *Бонь, Е. И.* Динамика гистологических изменений в парietальной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // *Нов. мед.-биол. наук (Морфология)*. – 2015. – Т. 11 (2). – С. 146–150.
41. *Бонь, Е. И.* Инволюция нейронов коры головного мозга потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // *Вест. НАН Беларуси*. – 2016. – № 1. – С. 390–404.

Поступила в редакцию 23.05.2016

УДК 612.6:616.37-008.6

Е. И. ГАЙШУН¹, И. В. ГАЙШУН², А. М. ПРИСТРОМ³

СПОСОБ ОЦЕНКИ «БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА» АРТЕРИЙ КАК ОДНОГО ИЗ ФАКТОРОВ СТАРЕНИЯ ОРГАНИЗМА

¹*1-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь, e-mail: gaishun-elena@mail.ru*

²*Институт математики НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: gaishun@im.bas-net.by*

³*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь*

Введено понятие «биологического возраста» артерии, ассоциированное с жесткостью сосудистой стенки, предложен способ его оценки. Получены расчетные формулы для определения «биологического возраста» общей сонной артерии.

Ключевые слова: биологический возраст, артериальная жесткость.

E. I. GAISHUN¹, I. V. GAISHUN², A. M. PRYSTROM³

METHOD OF ASSESSMENT OF THE “BIOLOGICAL AGE” OF ARTERIES AS ONE OF THE FACTORS OF ORGANISM AGEING

¹*1st City Clinical Hospital, Minsk, Belarus, e-mail: gaishun-elena@mail.ru*

²*Institute of Mathematic of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: gaishun@im.bas-net.by*

³*Belarussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus*

The concept of the “biological age” of an artery associated with the rigidity of a vascular wall is introduced and the method of its assessment is offered. In case of the common carotid artery, calculation formulas for definition of the “biological age” are obtained.

Keywords: biological age, arterial rigidity.

Введение. В настоящее время в качестве одного из критериев старения используется понятие биологического возраста (БВ), которое является интегральным показателем уровня здоровья человека, отражающим резервный потенциал организма. БВ может совпадать с календарным возрастом (ВК) (процесс старения физиологический), опережать (ускоренное старение) или отставать от него. Ускоренному старению способствуют разнообразные факторы, некоторые из них представлены в обзоре [1].

Существует большое количество методов определения БВ, в основу которых положены показатели физической и умственной работоспособности, биологической активности головного мозга, спирографии, эхокардиографии и др. [2–4]. Такие методы оперируют большим количеством параметров, вследствие чего оказываются недостаточно точными (например, часто, согласно этим методам, БВ молодых людей сильно завышен, а пожилых – занижен [3]). Поэтому наряду с оценкой БВ организма в целом представляется целесообразным определять БВ отдельных систем организма, наиболее сильно ассоциированных с процессом старения. Это позволяет существенно уменьшить количество необходимых показателей, а значит, повысить точность математических моделей БВ. К числу таких систем в первую очередь относится система кровообращения, которая является одним из главных звеньев в процессе старения и часто определяет его интенсивность. Информативным признаком старения системы кровообращения служит повышенная жесткость крупных артерий [5, 6]. В данной работе жесткость артерии положена в основу понятия ее «биологического возраста». Этот показатель определяется следующим образом: на основании экспериментальных данных предварительно устанавливается регрессион-

ная зависимость жесткости некоторой крупной артерии (или какого-либо участка артериального русла) от календарного возраста (ВК) у практически здоровых людей; у обследуемого пациента измеряется жесткость этой артерии и по регрессионной модели вычисляется такой ВК, при котором полученная жесткость соответствует возрастной физиологической норме. Вычисленный ВК и принимается за оценку БВ исследуемой артерии. Описанная схема определения БВ полностью реализована нами для общей сонной артерии (ОСА).

Цель исследования – установить зависимость жесткости общей сонной артерии от календарного возраста у практически здоровых людей и на основании этого разработать математические формулы, позволяющие рассчитать «биологический возраст» общей сонной артерии пациента.

Материалы и методы исследования. Оценка жесткости ОСА проводилась с помощью индекса жесткости

$$\alpha = \frac{\ln(P_s/P_d)}{\ln(D_s/D_d)},$$

представленного в монографии [6]. Здесь P_s и P_d – систолическое и диастолическое артериальное давление (АД), D_s и D_d – диаметр ОСА в систолу и диастолу. Отличительная особенность индекса α – слабая зависимость от АД [6], что позволяет пренебречь изменениями жесткости ОСА, вызванными колебаниями АД.

Для установления зависимости индекса α от ВК сформирована группа из 146 практически здоровых человек в возрасте 18–60 лет, состав которой представлен в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Состав группы практически здоровых людей

Пол	18–30 лет	31–50 лет	51–60 лет
Мужчины	22,5 ± 2,9 (n = 25)	42,1 ± 6,1 (n = 25)	54,5 ± 3,1 (n = 21)
Женщины	26,7 ± 2,7 (n = 25)	43,8 ± 5,8 (n = 25)	55,4 ± 2,6 (n = 25)

П р и м е ч а н и е. n – объем выборки; возраст = среднее ± стандартное отклонение.

Вопрос об отнесении каждого конкретного лица к числу здоровых решался на основании следующих критериев: отсутствие жалоб на состояние здоровья и указаний на заболевание респираторной, сердечно-сосудистой, эндокринной систем, хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, отсутствие изменений на ЭКГ покоя и в лабораторных анализах, нормальное значение АД в день обследования и отсутствие анамнестических указаний на наличие артериальной гипертензии, отсутствие проявлений ИБС (отрицательный результат при стандартном опросе для выявления стенокардии напряжения, отрицательный результат при проведении нагрузочных тестов, отсутствие нарушений ритма и проводимости, диагностически значимых изменений сегмента ST при холтеровском мониторинге), отсутствие патологических изменений брахиоцефальных артерий (в частности, отсутствие изменений со стороны комплекса интима-медиа, отсутствие атеросклеротических бляшек) при ультразвуковом сканировании, риск развития фатального сердечно-сосудистого заболевания в ближайшие 10 лет по шкале SKORE менее 1 % для лиц в возрасте 18–50 лет и менее 5 % для лиц в возрасте 51–60 лет. В группу не включались курящие лица, а также лица с избыточной массой тела и ожирением.

Согласно данным работ [6, 7], среди практически здоровых людей часто (в 19–33 % случаев) наблюдается повышенная жесткость ОСА, что свидетельствует о возможных доклинических стадиях развития некоторых патологических процессов, в первую очередь доклинической стадии атеросклероза. Поэтому из группы были исключены все лица (16 мужчин и 22 женщины) с повышенной жесткостью ОСА, выявление которых осуществлялось по методике, разработанной в работе [8]. В итоге сформировался окончательный состав группы, представленной в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Состав группы практически здоровых людей (возраст 18–60 лет) после исключения лиц с повышенной жесткостью общей сонной артерии

Пол	Средний возраст, лет
Мужчины (n = 55)	37,8 ± 13,7
Женщины (n = 53)	41,0 ± 12,4

Путем ультразвукового (дуплексного) сканирования у всех включенных в исследование измеряли диаметры D_s и D_d ОСА и методом Короткова определяли давление P_s , P_d на плечевой артерии. Затем рассчитывали значения индекса α . Результаты проведенных измерений и расчетов представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Основные показатели, определяющие жесткость общей сонной артерии в группе практически здоровых людей ($n = 108$)

Показатель	ВК, лет	P_s , мм рт. ст.	P_d , мм рт. ст.	D_s , мм	D_d , мм	α
М	39,3	117,5	74,4	6,1	5,3	3,6
SD	13,1	12,8	8,8	0,4	0,5	0,8
Me	40	120	80	6,0	5,3	3,5
95 % ДИ	(36,8; 41,8)	(115,1; 120,0)	(72,8; 76,1)	(6,0; 6,2)	(5,2; 5,4)	(3,4; 3,8)

П р и м е ч а н и е. М – среднее значение, SD – стандартное отклонение, Me – медиана, ДИ – доверительный интервал.

Поскольку жесткость артерий различна у мужчин и женщин одинакового возраста [5], то сформированная группа (табл. 2) была разделена на группу мужчин и группу женщин. Основные показатели, определяющие жесткость ОСА в этих группах, представлены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Основные показатели, определяющие жесткость общей сонной артерии в группах практически здоровых мужчин и женщин

Показатель	Мужчины ($n = 55$)				Женщины ($n = 53$)			
	М	SD	Me	95 % ДИ	М	SD	Me	95 % ДИ
ВК	37,8	13,7	40	(34,1; 41,5)	41,0	12,4	42	(37,5; 44,4)
P_s	122,9	8,6	120	(120,6; 125,2)	112,0	14,1	110	(108,1; 115,9)
P_d	78,2	6,1	80	(76,5; 79,8)	70,6	9,5	70	(68; 73,2)
D_s	6,2	0,4	6,2	(6,1; 6,3)	5,9	0,4	6,0	(5,8; 6,0)
D_d	5,5	0,4	5,5	(5,4; 5,6)	5,1	0,4	5,1	(5,0; 5,3)
α	3,8	0,8	3,7	(3,6; 4,0)	3,4	0,8	3,2	(3,2; 3,6)

Статистическая обработка данных проводилась на базе пакета компьютерных программ Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. С помощью регрессионного анализа [9] на основе данных табл. 3, 4 установлены уравнения линейной (ЛР) и квадратичной (КР) регрессии, описывающие зависимость индекса α от ВК в объединенной группе мужчин и женщин (ОГ), в группе мужчин (ГМ) и в группе женщин (ГЖ). Выяснилось, что уравнение КР в ГЖ имеет чрезвычайно малый ($\approx 4,6 \cdot 10^{-5}$) коэффициент при квадратичном слагаемом, поэтому уравнение КР практически не отличается от уравнения ЛР. Вследствие этого в группе ГЖ далее используется только уравнение ЛР. Для удобства все полученные зависимости индекса α от ВК объединены в табл. 5.

Т а б л и ц а 5. Линейная и квадратичная зависимость индекса α от календарного возраста

Группа	Вид уравнения	Уравнение
ОГ ($n = 108$)	ЛР	$\alpha = 1,8573 + 0,0443ВК$
	КР	$\alpha = 3,6052 - 0,0566ВК + 0,0013ВК^2$
ГМ ($n = 55$)	ЛР	$\alpha = 1,9833 + 0,048ВК$
	КР	$\alpha = 4,321 - 0,0946ВК + 0,0019ВК^2$
ГЖ ($n = 53$)	ЛР	$\alpha = 1,5362 + 0,0455ВК$

Заметим, что линейное уравнение регрессии проще для расчетов, чем квадратичное, однако квадратичное уравнение более точно определяет изменения индекса α в зависимости от ВК.

На рис. 1, 2 представлены графики линейного и квадратичного уравнений регрессии в ОГ и ГМ. Непосредственно из этих графиков следует, что для лиц моложе 25 лет и старше 50 лет ЛР занижает значения индекса α по сравнению с КР, а в возрастном диапазоне 25–50 лет – наоборот,

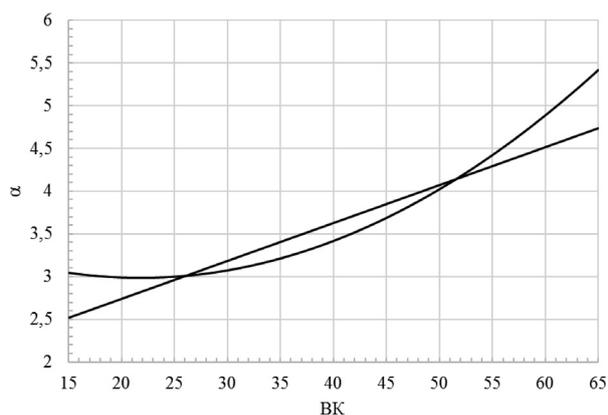


Рис. 1. Линейная и квадратичная зависимость индекса α от календарного возраста в общей группе

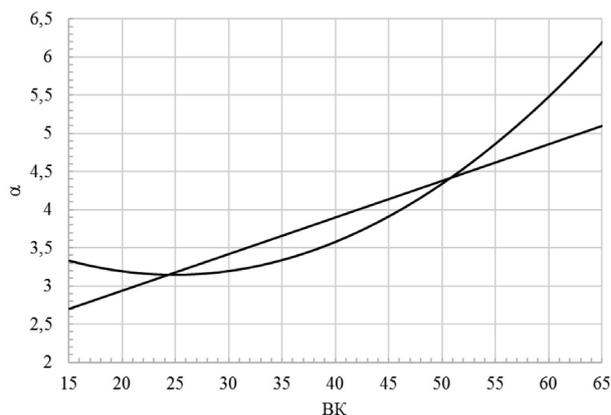


Рис. 2. Линейная и квадратичная зависимость индекса α от календарного возраста в группе мужчин

она завышает значения этого индекса. Различия между ЛР и КР увеличиваются для лиц моложе 20 лет и старше 55 лет.

Формулы, приведенные в табл. 5, позволяют оценить БВ ОСА любого пациента. Для этого следует ультразвуковым методом определить диаметр его ОСА в систолу и диастолу, методом Короткова установить АД, затем по этим данным вычислить значение α_0 индекса α . После этого БВ ОСА определяется из уравнения

$$\alpha = \alpha_0,$$

где α – соответствующая формула из табл. 5. Решение данного уравнения при различных зависимостях α от ВК приводит к формулам для оценки БВ ОСА, объединенным в табл. 6.

Т а б л и ц а 6. Формулы для оценки «биологического возраста» общей сонной артерии

Группа	Вид уравнения	Уравнение
ОГ	ЛР	$БВ = 22,6\alpha_0 - 41,9$
	КР	$БВ = 21,8 + 3,8 \sqrt{32 - 52(3,6 - \alpha_0)}$
ГМ	ЛР	$БВ = 20,8\alpha_0 - 41,3$
	КР	$БВ = 24,9 + 2,6 \sqrt{89 - 76(4,3 - \alpha_0)}$
ГЖ	ЛР	$БВ = 22\alpha_0 - 33,8$

Полученные выше результаты основаны всего лишь на одной выборке здоровых людей. Если использовать другие выборки, то зависимости из табл. 5 могут оказаться иными, что приведет к формулам для БВ ОСА, отличающимся от формул из табл. 6, а значит, и к другим оценкам БВ ОСА. Однако все такие оценки не сложно описать с помощью 95 %-ной доверительной области линии регрессии [9]. Обратимся к рис. 3, на котором изображена линия регрессии (r) и ее дове-

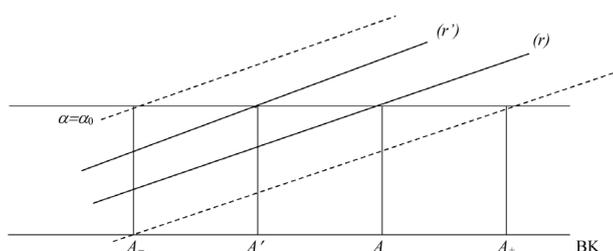


Рис. 3. Изменение «биологического возраста» общей сонной артерии при вариациях линии регрессии в доверительной области

рительная область, ограниченная пунктирными линиями. Для значения индекса $\alpha = \alpha_0$ БВ ОСА определяется точкой A – проекцией точки пересечения прямой $\alpha = \alpha_0$ с линией регрессии. При иной выборке линия регрессии займет другое положение (r') в доверительной области. Поэтому БВ ОСА окажется равным A' . Следовательно, каким бы ни было перемещение линии регрессии в доверительной области, оценка БВ ОСА, соответствующая значению α_0 индекса α , с вероятностью 0,95 будет находиться в интервале (A_-, A_+) , где A_- , A_+ – проекции точек пересечения прямой $\alpha = \alpha_0$ с граничными пунктирными линиями (рис. 3).

В случае ЛР метод построения доверительной области линии регрессии хорошо известен и описан, например, в книге [9]. На основании этого метода нами получены уравнения для величин A_- , A_+ (табл. 7) (при определении значений A_+ (A_-) в комбинациях \pm , \mp , содержащихся в формулах табл. 7, следует выбрать верхние (нижние) знаки).

Т а б л и ц а 7. Уравнения для определения величин A_- и A_+

Группа	Уравнение
ОГ	$185,7 + 4,4A_{\pm} \mp 1,2\sqrt{92,6 + 0,5(A_{\pm} - 39,3)^2} = 100\alpha_0$
ГМ	$198,3 + 4,8A_{\pm} \mp 1,1\sqrt{181,8 + (A_{\pm} - 37,8)^2} = 100\alpha_0$
ГЖ	$153,6 + 4,5A_{\pm} \mp 1,2\sqrt{188,7 + 1,3(A_{\pm} - 41)^2} = 100\alpha_0$

Решения этих уравнений проще всего получить с помощью известных пакетов компьютерных программ (например, Excel, Mathcad, Mathematica).

Поскольку зависимости из табл. 5 установлены на основании выборки практически здоровых людей ВК 18–60 лет, то точность формул из табл. 6 может уменьшиться, если расчетные значения БВ ОСА выходят за пределы интервала 18–60 лет, т. е. оказываются либо меньше 18 лет, либо больше 60 лет.

Чтобы дать представление о возможных отклонениях БВ ОСА от ВК, проводилась оценка БВ ОСА для 5 мужчин и 5 женщин из первичной группы 146 человек (табл. 1), при этом выбирались лица как с повышенной жесткостью ОСА, так и лица, у которых величина α_0 меньше среднего значения. Расчеты БВ ОСА проводились согласно линейной регрессии как в ОГ, так и отдельно в ГМ и ГЖ; соответствующие данные представлены в табл. 8.

Т а б л и ц а 8. Значения «биологического возраста» общей сонной артерии для 5 мужчин и 5 женщин

Мужчины						
α_0	3,8	4,3	4,2	3,3	4,7	
ВК	22	23	47	50	51	
БВ	ОГ	44	55,3	53,0	32,7	64,3
	ГМ	37,1	48,1	46,1	27,3	56,5
Женщины						
α_0	3,5	3,9	3,4	2,7	4,6	
ВК	22	30	48	46	54	
БВ	ОГ	37,2	46,2	34,9	19,1	62,1
	ГЖ	43,2	52	41	25,6	67,4

Анализ этих данных показывает, что БВ ОСА, полученный для мужчин в соответствии с ЛР в ОГ, выше, чем БВ ОСА, установленный на основании ЛР в ГМ. Для женщин ситуация обратная: ЛР в ОГ приводит к более низким значениям БВ ОСА, чем ЛР в ГЖ. Таким образом, ЛР в ОГ завышает оценки БВ ОСА у мужчин и занижает у женщин. Эти наблюдения не случайны, а являются закономерным следствием уже отмечавшегося факта, что жесткость артерий у мужчин выше, чем у женщин того же возраста.

Заключение. В данной работе жесткость некоторой артерии, описываемая индексом α , связывается с ее «биологическим возрастом». Последний определяется как такой календарный воз-

раст, при котором значение индекса α исследуемой артерии соответствует норме. Такое определение «биологического возраста» позволяет рассматривать его как один из факторов старения артериальной системы, а значит, и организма в целом.

Безусловно, полученные нами данные о «биологическом возрасте» только одной артерии (ОСА) нельзя считать исчерпывающей характеристикой старения артериальной системы. Поэтому представляют интерес оценки «биологического возраста» других артерий или участков артериального русла.

Список используемой литературы

1. Плакуев, А. Н. Современные концепции старения и оценки биологического возраста человека / А. Н. Плакуев, М. Ю. Юрьев, Ю. Ю. Юрьев // Экология человека. – 2011. – № 4. – С. 17–25.
2. Войтенко, В. П. Методика определения биологического возраста человека / В. П. Войтенко, А. В. Токарь, А. М. Полухов // Биологический возраст. Наследственность и старение. Геронтология и гериатрия. – Киев, 1984. – С. 133–137.
3. Белозерова, Л. М. Оценки биологического возраста по эхокардиографии / Л. М. Белозерова // Успехи геронтологии. – 2006. – Вып. 19. – С. 90–92.
4. Ларионова, Е. М. Способ определения биологического возраста / Е. М. Ларионова, И. М. Михалевич, А. В. Щербакова // <http://www.findpatent.ru/patent/229/2294692.html>.
5. Лелюк, В. Г. Ультразвуковая ангиология / В. Г. Лелюк, С. Э. Лелюк. – М.: Реал Тайм, 2007. – 416 с.
6. Гайшун, Е. И. Демпфирующая функция артерий и неинвазивные методы ее оценки / Е. И. Гайшун, И. В. Гайшун, А. М. Пристром. – Минск: Беларус. навука, 2016. – 92 с.
7. Гайшун, Е. И. Неинвазивная оценка жесткости общей сонной артерии как одного из признаков доклинической стадии атеросклероза / Е. И. Гайшун // Кардиология в Беларуси. – 2012. – № 2. – С. 135–141.
8. Пристром, А. М. Метод диагностики нарушения упругих свойств общей сонной артерии / А. М. Пристром, Е. И. Гайшун // Инструкция по применению. Рег. № 030-0313.2013.
9. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

Поступила в редакцию 09.06.2016.

УДК 616-006-053.2-07:577.21(091)(476)

Л. П. КИСЕЛЁВ, Т. В. САВИЦКАЯ, Н. В. ЛИПАЙ, О. В. АЛЕЙНИКОВА

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА В САРКОМАХ У ДЕТЕЙ

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
Минск, Беларусь, e-mail: leonslight@mail.ru*

Процесс образования новой патологической сосудистой сети (неоангиогенез) является критически важным для развития новообразования, но в то же время может представлять мишень для терапевтического воздействия. Целью исследования был поиск отличий в уровне экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (иРНК) спектра маркеров ангиогенеза в субстрате злокачественных и незлокачественных заболеваний перед началом терапии у пациентов детского возраста с костными и мягкотканными новообразованиями.

Изучена экспрессия широкого спектра маркеров ангиогенеза: факторы роста эндотелия сосудов VEGFA (включая изоформы 121, 165, 189) и VEGFC, рецепторы VEGFR1 и VEGFR2, фактор индукции гипоксии HIF-1 α , тканевой фактор и его ингибиторы (TF, TFPI-1, TFPI-2), ингибиторы активатора плазминогена (uPA, PAI-1) в образцах патологической ткани у 39 пациентов со злокачественной природой заболевания и у 23 – с незлокачественной.

В злокачественных опухолях констатирован значимо больший уровень экспрессии иРНК изоформ VEGFA121, VEGFA165 и соотношения VEGFA165/VEGFA189, в то время как экспрессия остальных маркеров была выше у пациентов без онкопатологии. Локализованные формы сарком костей и мягких тканей характеризовались значимо более высокими уровнем экспрессии TFPI-2 и значениями соотношения VEGFA165/VEGFA189 в сравнении с таковыми при метастатических формах ($P < 0,05$).

Следует отметить, что это первое исследование такой комбинации маркеров ангиогенеза. Показано, что экспрессия значительной части спектра факторов ангиогенеза не является прерогативой неоплазм и может быть выше у пациентов без онкопатологии. Соотношение изоформ VEGFA165/VEGFA189 вместе с уровнем TFPI-2 отличает пациентов с локализованными (неметастатическими) формами сарком от когорты лиц с IV стадией заболевания. Эти показатели могут расцениваться как убедительные прогностические маркеры онкологического процесса.

Ключевые слова: ангиогенез, ткань опухоли, саркомы костей и мягких тканей у детей, диагностика и лечение.

L. KISIALEU, T. SAVITSKAIA, N. LIPAI, O. ALEINIKOVA

EXPRESSION OF THE ANGIOGENESIS FACTORS OF SARCOMA IN CHILDREN

*Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus, e-mail: leonslight@mail.ru*

The formation of a new pathological vasculature (angiogenesis) is critical for the cancer development, can reflect the behavior of tumors and can be considered as an angiogenesis inhibitors target. The objective of the study was to find differences in the mRNA (messenger ribonucleic acid) expression levels of varied angiogenesis markers in malignant and non-malignant pathological foci.

Angiogenesis markers VEGFA (including isoforms of 121, 165, 189), VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α , TF, TFPI-1, TFPI-2, uPA, PAI-1 in pediatric specimens were examined using quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (qRT-PCR). 62 (39 malignant and 23 nonmalignant samples) from pediatric patients with bone and soft tissues pathology were studied.

A significantly higher level of isoforms VEGFA121, VEGFA165 as well as the VEGFA165/VEGFA189 ratio ascertained for malignancies. Other markers expression levels were higher in patients without cancer pathology. Both, the TFPI-2 level and the VEGFA165/VEGFA189 ratio identified upward for localized cancer vs. metastatic forms ($P < 0.05$). According to our knowledge, this is the first study of such angiogenesis markers combination. The demonstrated expression of several angiogenesis factors is not the extraordinary prerogative of neoplasms and may be greater in patients without malignancy. The VEGFA165/VEGFA189 ratio together with the TFPI-2 level distinguished localized and metastatic cancer patients and can be used as a tumor prognostic marker.

Keywords: angiogenesis, pediatric patients, tissue tumors, sarcomas of bone and soft tissues.

Введение. Саркомы представляют группу гетерогенных заболеваний мезенхимальной природы, рост и развитие которых зависит от процесса формирования собственной сосудистой сети, известного также как ангиогенез или неоангиогенез [1–4]. В литературных источниках представ-

ляется все больше данных о том, что маркеры опухолевого ангиогенеза могут коррелировать с конкретными клиническими признаками у пациентов с саркомами [5–7]. Процесс формирования сосудистой сети обусловлен широким спектром маркеров. В первую очередь это представитель семейства факторов роста – фактор роста эндотелия сосудов VEGF (vascular endothelial growth factor), его изоформы, а также рецепторы взаимодействия. VEGF является фундаментальным медиатором как патологического, так и физиологического ангиогенеза. В семействе VEGF выделяют VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF и плацентарный фактор роста (PLGF). Точками приложения VEGFA являются хемотаксис и дифференцировка предшественников эндотелиоцитов [5]. Выделяют как минимум 5 изоформ VEGFA, обозначаемых по количеству аминокислотных оснований в каждой (VEGFA121, VEGFA145, VEGFA165, VEGFA189 и VEGFA206 соответственно). Наименьшая из них, VEGFA121, обладает максимальной растворимостью и действует как митогенный фактор для сосудистого эндотелия. VEGFA165, уровень которого является наибольшим среди других изоформ, рассматривается как обладающий максимальным потенциалом к стимуляции генеза сосудистой сети. VEGFA189 представлен в сравнительно небольших концентрациях и является лигандом рецептора VEGFR-3, презентированного в основном в лимфатических сосудах [5, 6]. VEGFA участвует в регуляции процесса гипоксии и естественным образом связан с фактором, индуцирующим гипоксию HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) [7]. VEGFC наряду со стимуляцией сосудистого эндотелия обеспечивает клеточную миграцию (рецепторами являются VEGFR3, реже VEGFR2), но его ангиогенный потенциал меньше по сравнению с VEGFA [8].

Ингибиторы проводящих путей тканевого фактора TFPIs (tissue factor pathway inhibitors) – обратимые ингибиторы коагулянта тканевого фактора и сигнальной активности клетки. *In vitro* и *in vivo* показана способность TFPI-1 к антиангиогенному и противометастатическому эффекту. TFPI-2 – структурный аналог TFPI-1, его экспрессия обратно пропорциональна повышению степени злокачественности и распространенности новообразования. Таким образом, TFPI-2 может рассцениваться как фактор ограничения роста опухоли в организме [9, 10].

Существенное значение на формирование опухолевой сосудистой сети оказывают протеазы и их ингибиторы. В частности, система активации плазминогена и VEGF взаимосвязаны и являются синергистами в процессе инвазии опухоли. Активаторы плазминогена урокиназного типа uPA (urokinase-type plasminogen activator) и его антагонист PAI-1 (plasminogen activators inhibitor-1) продуцируются нормальными и опухолевыми клетками и играют ключевую роль в деградации и ремоделировании межклеточного матрикса, деструкции базальной мембраны и метастазировании. Повышение уровня uPA ассоциируется с плохим прогнозом заболевания [11, 12].

Таким образом, экспрессия опухолью компонентов ангиогенеза (в первую очередь VEGF) классически рассматривается как отрицательный прогностический фактор, ассоциирующийся с метастазированием и химиорезистентностью, однако результаты последних исследований указывают на необходимость детализации спектра маркеров для более индивидуальной оценки клинической значимости его составляющих.

Цель настоящего исследования – анализ уровней экспрессии иРНК расширенного спектра маркеров ангиогенеза, который включал не только классические компоненты VEGF, но также TFPI-1, TFPI-2, uPA и PAI-1 в ткани опухоли пациентов детского возраста с костными и мягкоткаными саркомами.

Материалы и методы исследования. *Пациенты.* Исследуемая когорта была сформирована с ноября 2008 г. по март 2011 г. и состояла из пациентов детского возраста, которые были обследованы в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии Минздрава Республики Беларусь в связи с подозрением на наличие онкопатологии костных структур или мягких тканей. В результате диагностического оперативного вмешательства (биопсии) получены 62 образца тканей первичных патологических очагов до начала специального лечения. Критерием включения пациента в исследование было наличие достаточного количества материала и гистологическое (при необходимости – иммуногистохимическое и молекулярно-биологическое) подтверждение диагноза. Пациентов, получавших специальное противоопухолевое лечение до получения образца ткани, в исследование не включали. Среди 39 (62,9 %) пациентов с онкозаболеванием у 16 (41,0 %) диагностирована саркома Юинга (СЮ),

у 16 (41,0 %) – остеосаркома (ОС), у 7 (18,0 %) – рабдомиосаркома (РМС). Для 23 (37,1 %) пациентов диагноз онкозаболевания был исключен: у 5 были незлокачественные образования кости (остеоид-остеома, остеокластома, остеобластома, хондрома), у 5 – остеомиелит, у 3 – фиброзная дисплазия, у 3 – аневризальная костная киста, у 3 – посттравматические изменения, у 1 – гранулематозное воспаление, у 1 – аневризальная киста, у 1 – фиброматоз мягких тканей, у 1 – оссифицирующий миозит бедра.

Диагноз и стадию (распространение) опухоли устанавливали согласно критериям международных протоколов:

для ОС – ЕВРОАМОС (EuRAMOS1 Protocol, Version 1.0, 30 September 2004);

для СЮ – ЕВРОЮИНГ (EURO-E.W.I.N.G.99 Protocol, Version 1999-09-27);

для РМС – РМС-2005 (RMS 2005, EpSSG Protocol Final Version January 2005).

Характеристики исследуемой когорты пациентов представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Характеристики пациентов (n = 62)

Характеристики	Злокачественные опухоли				Незлокачественные образования (n = 23)	P
	Всего (n = 39)	СЮ (n = 16)	ОС (n = 16)	РМС (n = 7)		
Мальчики	24 (61,5 %)	10 (62,5 %)	10 (62,5 %)	4 (57,1 %)	15 (65,2 %)	>0,05
Девочки	15 (38,5 %)	6 (37,5 %)	6 (37,5 %)	3 (42,9 %)	8 (34,8 %)	
Средний возраст, лет	12,5	12,4	13	11,9	12,4	
Медиана возраста, лет	13	12	14	15	14	>0,05
Стадия II	24 (61,5 %)*	11 (68,8)*	11 (68,8 %)*	2 (28,6 %)	–	<0,05*
Стадия III	2 (5,2 %)	–	–	2 (28,6 %)	–	
Стадия IV	13 (33,3 %)*	5 (31,3)*	5 (31,3 %)*	3 (42,8 %)	–	<0,05*

*Разница в показателях характеризуется как статистически значимая.

Выделение РНК и синтез кДНК. Образцы тканей получали непосредственно после операции и замораживали в жидком азоте. Для гомогенизации использовали гомогенизатор Retsch (XX, Германия). Для приготовления РНК и обратной транскриптазы-полимеразной цепной реакции в реальном времени (Реал-тайм ПЦР) тотальную РНК выделяли с использованием RNeasy Mini Kit (Qiagen, XX, Германия) согласно инструкции производителя. Количественные показатели концентрации РНК оценивали посредством спектрофотометрии. Тотальную РНК (1,5 мкг) из ткани конвертировали в первую цепь ДНК с использованием случайного праймера (0,3 мкг) и обратной транскриптазы 200 U мышиного вируса лейкемии (Moloney murine leukemia virus, M-MLV; Promega, XX, США).

Количественная обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция. Исследовано 11 генов в оригинальных образцах: VEGFA (включая изоформы VEGFA121, VEGFA165 и VEGFA189), VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α , TF, TFPI-1, TFPI-2, uPA, PAI-1. В качестве внутреннего контрольного гена использовали глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH). Для количественного определения генов применяли метод флуоресценции на основе реального времени (Taqman). ПЦР в реальном времени для генов VEGFA, VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α , TF, TFPI, TFPI-2, uPA, PAI проводили с использованием коммерческих систем (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems, Foster City, CA; ID Hs00900054 мл, Hs01099203 мл, Hs01052940 мл, Hs00911690 мл, Hs01047659 мл, Hs00936377 мл, Hs00175225 мл, Hs00409206 мл, Hs00197918 мл, Hs01547050 мл, Hs01126603 мл соответственно). Праймеры и зонды для количественной оценки VEGF изоформ в ПЦР в реальном времени применяли, как описано в работе Gustafsson и соавт. [13]. ПЦР проводили в реальном времени реакции в 20 мкл реакционной смеси с окончательным разведением 1 \times в (Taqman PCR universalmaster mix, Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя, используя оборудование Icycler (Bio-Rad, Hercules). Относительные величины иРНК генов в образцах рассчитывали по показателям стандартных кривых, полученных путем амплификации серийного разведения обратно транскрибированной тотальной РНК. Значения исследованных показателей представлены в виде относительных величин.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета программы STATISTICA 6.0. Количественные данные представлены с определением медианы (Ме [25; 75]), минимумов–максимумов, качественные данные выражены в абсолютных величинах и процентах. Проверка гипотез о равенстве двух средних проводилась с помощью *U*-критерия Манна–Уитни или Фишера (для количественных признаков). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки менее 5 % ($P < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Уровни экспрессии исследованного спектра факторов ангиогенеза в ткани опухоли и ткани незлокачественных патологических очагов представлены в табл. 2. Анализируя данные табл. 2, можно отметить, что уровни экспрессии большинства

Т а б л и ц а 2. Уровни экспрессии исследованного спектра факторов ангиогенеза в ткани опухоли и ткани незлокачественных патологических очагов

Фактор	Злокачественные опухоли ($n = 38$) Медиана (25%–75%), минимум–максимум	Незлокачественные образования ($n = 23$) Медиана (25%–75%), минимум–максимум	<i>P</i>
TF	1,106 (0,389–2,557) 0,037–38,021	3,114 (0,754–4,986) 0,047–102,000	0,0509
TFPI-1	0,516 (0,338–1,154) 0,007–21,486	2,070 (0,967–2,962) 0,382–16,105	0,0003
TFPI-2	0,117 (0,035–0,302) 0,001–8,704	0,543 (0,355–2,347) 0,052–10,881	0,0004
uPA	0,418 (0,174–0,781) 0,006–15,829	3,016 (1,207–5,572) 0,002–18,782	0,0006
PAI-1	1,877 (0,645–4,513) 0,037–38,021	2,553 (1,002–5,155) 0,0382–26,287	0,2043
HIF-1 α	2,028 (1,387–3,768) 0,088–98,021	12,861 (7,717–19,773) 0,534–111,111	0,0002
VEGFR-1	4,937 (2,312–9,167) 0,003–135,803	21,865 (7,368–50,569) 0,034–118,684	0,0009
VEGFR-2	5,794 (2,838–13,517) 0,009–44,589	24,488 (10,000–55,447) 0,000–193,158	0,0011
VEGFR-3	18,574 (6,274–47,085) 0,163–390,741	81,181 (36,866–159,734) 3,159–905,263	0,0004
VEGFA	4,007 (1,804–6,253) 0,032–113,095	3,311 (1,801–5,732) 0,620–24,959	0,9414
VEGFC	0,782 (0,506–1,717) 0,011–321,143	2,244 (1,596–8,792) 0,419–50,425	0,0006
VEGFA121	3,425 (2,281–6,908) 0,215–20,390	1,500 (0,567–3,244) 0,015–81,642	0,0166
VEGFA165	2,516 (1,166–5,504) 0,126–127,451	1,124 (0,502–3,733) 0,017–7,360	0,0228
VEGFA189	4,195 (1,526–11,854) 0,087–297,059	2,859 (1,351–8,300) 0,026–79,208	0,4271
VEGFA165/ VEGFA189	0,720 (0,62–0,933) 0,172–213,093	0,400 (0,282–0,539) 0,093–1,085	0,0034

исследуемых маркеров имели значительные отличия. Статистически значимо большая медиана экспрессии иРНК в незлокачественной ткани отмечена для TFPI-1 (2,070 против 0,516; $P = 0,0003$), TFPI-2 (0,543 против 0,117; $P = 0,0004$), uPA (3,016 против 0,418; $P = 0,0006$), HIF-1 α (12,861 против 2,028; $P = 0,0002$), VEGFR-1 (21,865 против 4,937; $P = 0,0009$), VEGFR-2 (24,488 против 5,794; $P = 0,0011$), VEGFR-3 (81,181 против 18,574; $P = 0,0004$) и VEGFC (2,244 против 0,782; $P = 0,0006$). В то же время определены факторы ангиогенеза, экспрессия которых была больше в опухолевых очагах: VEGFA121 (1,500 против 3,425; $P = 0,0166$), VEGFA165 (1,124 против 2,516; $P = 0,0228$) и соотношения VEGFA165/VEGF189 (0,400 против 0,720; $P = 0,0034$).

При индивидуальном сравнении констатируется сильная корреляция значений экспрессии двух изоформ: VEGFA165 и VEGFA189 как в опухолевой ткани ($R = 0,8210$, $P = 0,010$), так и в неопухолевых очагах ($R = 0,9110$, $P = 0,013$).

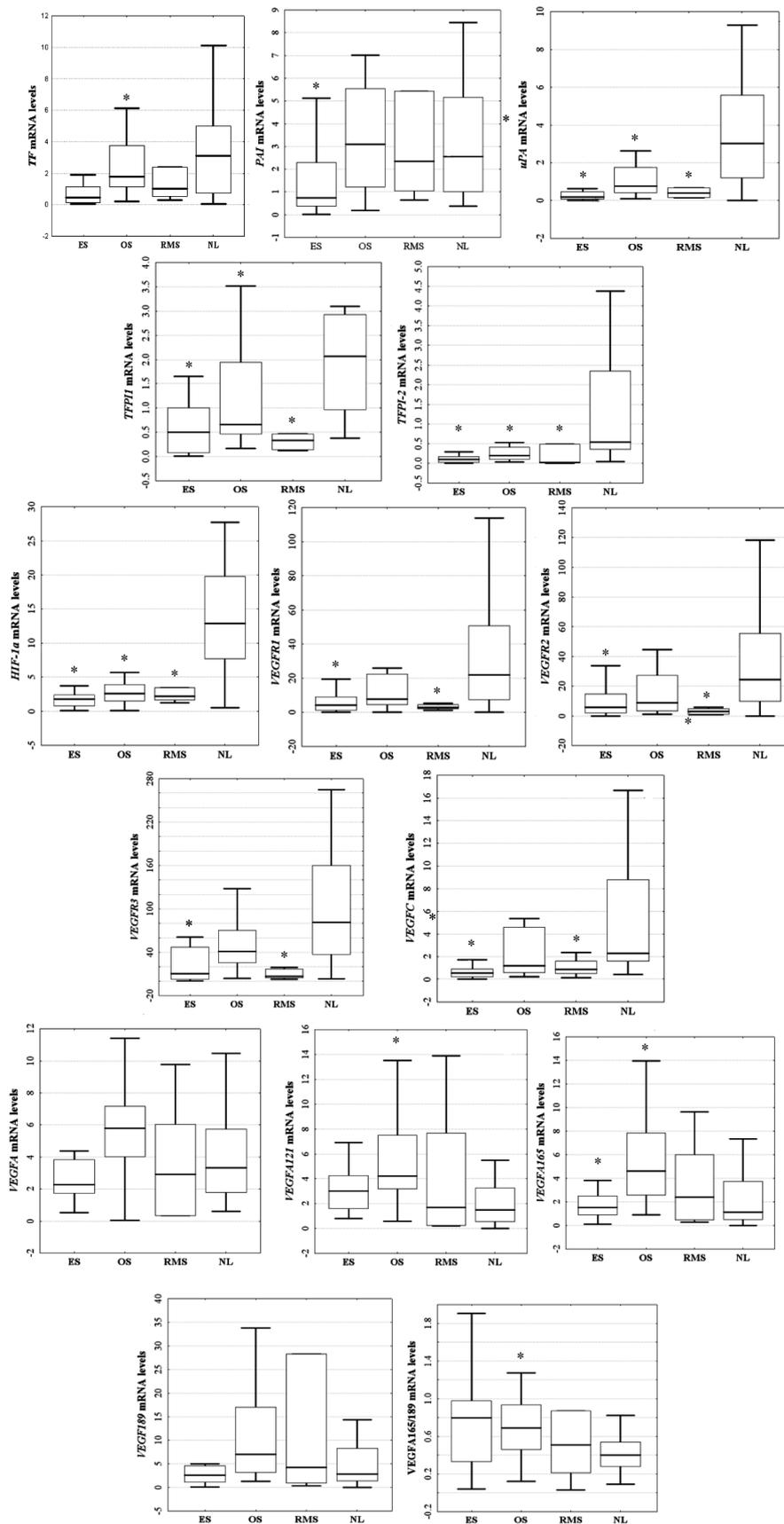
Относительные уровни экспрессии иРНК генов факторов ангиогенеза в выделенных группах сарком в зависимости от нозологии процесса представлены на рисунке. Характеризуя представленные данные в группах пациентов с ОС, СЮ и РМС можно говорить об общих тенденциях с объединенной группой пациентов с онкопатологией: более высокие показатели экспрессии VEGFA121, VEGFA165, соотношения VEGFA165 и низкие (по сравнению с неопухолевыми очагами) уровни остальных факторов ангиогенеза.

Уровни экспрессии иРНК факторов ангиогенеза в тканях незлокачественных очагов. Группа незлокачественных заболеваний в исследовании достаточно гетерогенна и включает пациентов с заболеваниями, для которых рутинно осуществляется дифференциальная диагностика злокачественного и незлокачественного процесса: доброкачественные и воспалительные изменения костных и мягких тканей. В подгруппах не отмечено значимых различий в уровне экспрессии факторов ангиогенеза (данные не представлены), кроме больших значений VEGFR1 (34,4186 против 12,2564; $P = 0,0267$), VEGFR2 (35,1163 против 18,8205; $P = 0,0433$) и TFPI-1 (2,9261 против 1,6039; $P = 0,0269$) для когорты пациентов с воспалительным процессом.

Уровни экспрессии иРНК факторов ангиогенеза в ткани опухоли пациентов с локализованным и распространенным онкологическим процессом. Уровни только двух компонентов из исследованного спектра факторов ангиогенеза значимо отличались в группах пациентов, сформированных в зависимости от наличия метастазов на момент постановки диагноза. Экспрессия TFPI-2 (0,0939 против 0,1783; $P = 0,0405$) и соотношение изоформ VEGFA165/VEGFA189 (0,6765 против 0,8235; $P = 0,0073$) при распространенном онкологическом процессе были ниже, чем при локализованных формах заболевания.

Костные и мягкотканые саркомы представляют группу гетерогенных заболеваний мезенхимальной природы. Несмотря на существующие алгоритмы морфологической диагностики биопсийных препаратов при постановке онкологического диагноза, до настоящего времени остается актуальным вопрос, могут ли быть обнаружены какие-либо дополнительные маркеры, способствующие дифференцировке злокачественной и незлокачественной природы заболевания. Формирование опухоли патологической сосудистой сети происходит на фоне физиологического ангиогенеза, который особенно активен в детском растущем организме [1–4]. Нет сомнения в том, что маркеры ангиогенеза, продуцируемые опухолевым субстратом, могут быть не только удобной мишенью для таргетной терапии, но и служить критериями для прогнозирования течения и исхода заболевания. В настоящей работе нами исследованы уровни экспрессии иРНК у пациентов детского возраста с патологией костей и мягких тканей. Проведено сравнение между уровнями экспрессии у пациентов с онкопатологией и у лиц без злокачественного процесса. Изучены компоненты VEGF, протеазы и их ингибиторы, а также ингибиторы проводящих путей тканевого фактора. Согласно полученным результатам, уровни экспрессии VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α , TFPI-1, TFPI-2 и uPA выше в неопухолевых очагах ($P < 0,05$) по сравнению с таковыми как в общей когорте онкобольных, так и в группах пациентов с отдельными видами нозологии (СЮ, ОС, мягкотканые опухоли).

В литературе представлены факты, что приблизительно 15–20 % всех злокачественных опухолей могут быть инициированы или усугублены наличием воспалительного процесса. Воспаление, так же как и ангиогенез, стимулирует образование цитокинов, факторов роста, про-



Экспрессия иРНК генов факторов ангиогенеза в зависимости от нозологии онкологического процесса. * – $P < 0,05$, характеризует разницу в экспрессии типа опухоли и неонкологических очагов

теолитической ферментов, протеогликанов, липидных медиаторов и простагландинов [10]. Гипоксические процессы в участках воспаления физиологически сопровождаются метаболическими сдвигами и гиперэкспрессией фактора HIF-1, который в свою очередь стимулирует синтез факторов ангиогенеза [14, 15]. Таким образом, наши данные подтверждают гипотезу о том, что гиперэкспрессия некоторых факторов ангиогенеза не является прерогативой только злокачественных новообразований и не может однозначно рассматриваться как диагностический критерий наличия саркомы в детском организме.

С другой стороны, в настоящем исследовании отмечен статистически значимо более высокий уровень экспрессии некоторых изоформ VEGFA: VEGFA121, VEGFA165 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в тканях злокачественных опухолей. По известным на сегодняшний день данным, биологическая роль различных изоформ VEGFA до конца не определена. VEGFA121 и VEGFA165 секретируются в эндотелиальных клетках и способствуют их активному митозу. Изоформы с большим количеством аминокислот, VEGFA165 и VEGFA189, ассоциируются в основном с присутствием в клетках, хотя тоже обладают сосудистой проницаемостью. Считается, что VEGFA165 более «выгодна» для опухоли, чем VEGFA189, хотя обе изоформы участвуют в локальном ангиогенезе. Отмечено, что при дефиците VEGFA165 компенсаторно повышается уровень VEGFA189, однако это не сопровождается усилением инвазии опухоли в костный мозг. Соотношение вне- и внутриклеточных изоформ VEGFA рассматривается рядом авторов как значимый биологический маркер, что подтверждено результатами нашего исследования [16, 17]. Данные литературы свидетельствуют о повышенной экспрессии VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189 при остеосаркоме, почечно-клеточном раке, мелкоклеточном раке легкого, колоректальном раке, саркоме Юинга, что ассоциировалось с ранней прогрессией опухоли и плохим прогнозом заболевания [17, 18]. По нашим данным, уровень экспрессии этих маркеров у пациентов со злокачественными саркомами значимо выше, чем у лиц без онкопатологии, а соотношение VEGFA165/VEGFA189 у пациентов с VI стадией заболевания меньше, чем у лиц с локализованными формами онкологического процесса ($P < 0,05$). Также установлена корреляция между экспрессией этих изоформ как в опухолевой ткани ($R = 0,8210$, $P = 0,010$), так и в неопухолевых очагах.

Статистически значимые отличия в уровне экспрессии TFPI-2 установлены в группах пациентов в зависимости от наличия метастазов на момент диагноза. Этот ген рассматривается в качестве опухолевого супрессора, в том числе как ингибитора ангиогенеза [18, 19]. В нашем исследовании уровни TFPI-1 и TFPI-2 в незлокачественных патологических очагах были значимо меньше, чем в опухолевой ткани. Представляется важным дальнейшее изучение роли ингибиторов проводящих путей тканевого фактора в качестве онкомаркера со значительным прогностическим потенциалом.

Заключение. Такие маркеры, как VEGFC, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α и uPA, показали больший уровень экспрессии иРНК при незлокачественной патологии по сравнению с опухолевой тканью и не могут ассоциироваться только с процессами опухолевого ангиогенеза.

Отличительными особенностями сарком костных и мягких тканей у детей являются уровни экспрессии VEGFA121, VEGFA165, а также соотношение VEGFA165/VEGFA189.

Низкий показатель соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 наряду с низким уровнем иРНК экспрессии гена TFPI-2 статистически значимо отличает пациентов с распространенным онкологическим процессом от лиц с локализованными формами заболевания и может быть использован в качестве прогностического маркера у пациентов детского возраста с саркомами костей и мягких тканей.

Список использованной литературы

1. Достижения детской онкологии и гематологии в Республике Беларусь / О. В. Алейникова [и др.] // Актуальные вопросы детской онкологии и гематологии: материалы VIII междунар. симп. – Минск, 2000. – С. 3–8.
2. Суконко, О. Г. Организационно-методическая помощь, оказываемая государственным учреждением РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова организациям здравоохранения в Республике Беларусь / О. Г. Суконко, Н. А. Антоненкова // Онкол. журн. – 2011. – № 20. – С. 42–45.
3. Неоперируемый рак щитовидной железы: эффективность диагностики и выживаемость / Ю. Е. Демидчик [и др.] // Онкол. журн. – 2008. – № 8. – С. 9–21.

4. Роль молекулярных часов в патогенезе и терапии злокачественных новообразований / Э. А. Жаврид [и др.] // Мед. панорама. – 2011. – № 7. – С. 19–23.
5. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK): explanation and elaboration / D. G. Altman [et al.] // BMC Med. – 2012. – N 10. – P. 51.
6. Adams, R. H. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis / R. H. Adams, K. Alitalo // Nature. – 2007. – N 8. – P. 464–468.
7. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of dalotuzumab (MK-0646), an anti-insulin-like growth factor-1 receptor monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors / F. Atzori [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2011. – N 17. – P. 6304–6312.
8. Determination of microvessel density by quantitative real-time PCR in esophageal cancer: correlation with histologic methods, angiogenic growth factor expression and lymph node metastasis / S. Loges [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2007. – N 13. – P. 76–80.
9. Belting, M. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer / M. Belting, J. Ahamed, W. Ruf // Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. – 2005. – N 25. – P. 1545–1550.
10. Ono, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy / M. Ono // Cancer Sci. – 2008. – N 99. – P. 1501–1506.
11. McMahon, B. The plasminogen activator system and cancer / B. McMahon, H. C. Kwaan // Pathophysiol. Haemost. Thromb. – 2007. – N 8. – P. 184–194.
12. Wojtukiewicz, M. Z. The role of hemostatic system inhibitors in malignancy / M. Z. Wojtukiewicz, E. Sierko, W. Kisiel // Semin. Thromb Hemost. – 2007. – N 33. – P. 621–642.
13. VEGF-A splice variants and related receptor expression in human skeletal muscle following submaximal exercise / T. Gustafsson [et al.] // J. Appl. Physiol. – 2005. – N 98. – P. 2137–2146.
14. Lu, H. Inflammation, a key event in cancer development / H. Lu, W. Ouyang, C. Huang // Mol. Cancer Res. – 2006. – N 4. – P. 221–233.
15. Pugh, C. W. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system / C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe // Nat. Med. – 2003. – N 9. – P. 677–684.
16. Production of VEGF165 by Ewing's sarcoma cells induces vasculogenesis and the incorporation of CD34⁺ stem cells into the expanding tumor vasculature / T. H. Lee [et al.] // Int. J. Cancer. – 2006. – N 119. – P. 839–846.
17. DuBois, S. Angiogenesis and Vascular Targeting in Ewing Sarcoma / S. DuBois, N. Marina, J. Glade-Bender // Cancer. – 2010. – N 1. – P. 749–757.
18. Ferrara, N. The biology of VEGF and its receptors / N. Ferrara, H. P. Gerber, J. Le Coutre // Nat. Med. – 2003. – N 9. – P. 669–676.
19. VEGF121 promotes lymphangiogenesis in the sentinel lymph nodes of non-small cell lung carcinoma patients / H. Kawai [et al.] // Lung Cancer. – 2008. – N 59. – P. 41–47.

Поступила в редакцию 18.04.2016

АГЛЯДЫ

УДК 577.21:571.27:57.085.2

А. В. ШАХБАЗОВ

НЕЙРОИНДУЦИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Университет Калгари, Канада, e-mail: shakhbazau@gmail.com

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) рассматриваются как перспективный терапевтический агент при ряде заболеваний, включая неизлечимые патологии нервной системы. В данном обзоре обсуждается терапевтическое применение МСК, подвергнутых дифференцировке в неконвенционном нейрогенном направлении. Проведен анализ данных по нейродифференцировке МСК в культуре *in vitro*, результатов исследований на подопытных животных, а также последних данных клинических испытаний нейродифференцированных МСК в Беларуси и за рубежом для лечения пациентов с диагнозами «боковой амиотрофический склероз» и «эпилепсия».

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки человека, нейрогенная дифференцировка, боковой амиотрофический склероз, эпилепсия.

A. V. SHAKHBAZAU

NEURO-INDUCED MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF NERVOUS SYSTEM DISEASES

University of Calgary, Canada, e-mail: shakhbazau@gmail.com

Mesenchymal stem cells (MSCs) have long been viewed as a promising therapeutic agent for incurable CNS disorders. This review covers therapeutic applications of MSCs induced for a non-conventional neural differentiation. Presented are the data on MSCs neural induction *in vitro*, lessons from animal models, and very recent results of clinical trials with neurally induced MSCs in Belarus and worldwide in patients suffering from amyotrophic lateral sclerosis and epilepsy.

Keywords: human mesenchymal stem cells, neural differentiation, amyotrophic lateral sclerosis, epilepsy.

Стволовые клетки (СК) характеризуются способностью самообновляться, образуя новые СК, и дифференцироваться в специализированные клетки органов и тканей. Они играют ключевую роль в формировании и функционировании организма на различных стадиях его развития и являются одним из наиболее активно изучаемых объектов современной физиологии, эмбриологии и генетики благодаря своей уникальной роли клеточного резервуара для поддержания и восстановления функции органов и тканей. Многие типы СК показали хорошие результаты в клеточной терапии широкого спектра патологий как в опытах на животных, так и в клинических испытаниях. Активно изучаются эмбриональные и фетальные СК, более специализированные СК различных типов тканей (нервной ткани, прекурсоры кожи), широкое распространение имеют технологии получения индуцированных плюрипотентных клеток с использованием комбинации химических факторов и/или трансгенеза. В качестве терапевтических агентов внимание исследователей и клиницистов привлекают СК взрослого организма в силу их относительной доступности, безопасности и отсутствия этических проблем. Наиболее исследованы в этом плане мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделяемые из костного мозга (КМ), пуповинной и периферической крови, плаценты, жировой ткани и других источников. МСК поддерживают гемопоэз в КМ и являются популяцией СК, способных к дифференцировке в различные типы

клеток (остеобласты, хондроциты, адипоциты, миобласты, гепатоциты и др.). Кроме того, они соответствуют ряду критериев идеального клеточного трансплантата [1]: легкодоступны для выделения, способны к быстрому размножению в культуре, иммунологически совместимы, способны к долговременному выживанию после имплантации и к интеграции в ткани реципиента. Подобные свойства позволили активно задействовать МСК пациентов в клинических испытаниях при различных патологиях. В частности, показана возможность их использования в лечении инсульта [2], инфаркта миокарда [3], метахроматической лейкодистрофии [4] и других заболеваний [5].

Недавно у МСК обнаружены такие важные дополнительные качества, как способность секретировать нейропротективные факторы и противовоспалительные цитокины, а также способность к трансдифференцировке в клетки нервной ткани, что позволяет рассматривать их и в качестве кандидатов для терапии неизлечимых заболеваний нервной системы. МСК взрослого человека показали экспрессию 12 нейроассоциированных генов, 8 генов, связанных с допаминэргической системой, и 11 факторов транскрипции, играющих существенную роль в регуляции нервной системы [6]. Концепция клеточной терапии зиждется на двух основных ожиданиях: замещении поврежденных клеток и эффектах секретируемых клетками факторов. МСК способны выделять широкий спектр полезных агентов: ростовые факторы, цитокины, хемокины, нейротрофины, молекулы адгезии и проч., что дает им не только возможность трофической поддержки в зоне инъекции, но и потенциал локальной и системной иммуномодуляции посредством паракринных факторов. Важным обстоятельством является контекст-зависимый характер продуцируемых факторов, т. е. «реакция» МСК на характер конкретной патологии. Так, в модели эпилепсии после инъекции МСК показано выделение ими факторов FGF-6, G1TR, MIP-3 β , амфирегулина и остеопротегерина [7], тогда как в модели повреждения спинного мозга после инъекции МСК обнаружена секреция bFGF, NT-3, NAP-2, G1TR и VEGF-R3 [7, 8].

Многочисленные эксперименты по трансплантации МСК на различных моделях невропатологий подопытных животных показали отличные результаты в плане нейропротекции, функционального восстановления и улучшения выживаемости [7, 9–15]. Основную роль в терапевтическом эффекте МСК, по-видимому, играли секретируемые факторы, тогда как свидетельства о вкладе трансдифференцировки в зоне имплантации крайне малочисленны [16]. В качестве независимых примеров серьезных заболеваний нервной системы, в лечении которых секретируемые факторы МСК и их противовоспалительный эффект могут существенно способствовать стабилизации, можно привести боковой амиотрофический склероз (БАС) и эпилепсию.

Боковой амиотрофический склероз – прогрессирующее неизлечимое нейродегенеративное заболевание, основой патогенеза которого является гибель моторных нейронов головного и спинного мозга и развитие неуклонно прогрессирующей мышечной слабости [17]. При БАС происходит поражение как верхних (моторная кора головного мозга), так и нижних (передние рога спинного мозга, ядра черепно-мозговых нервов) моторных нейронов, приводящее к параличам и последующей атрофии мышц. В основе развития БАС лежит нарушение метаболизма и изменение конформации клеточных белков с их последующим накоплением и агрегацией в нервных клетках [18]. Отсутствие эффективного лечения БАС требует поиска новых терапевтических технологий. Одним из потенциальных методов лечения БАС может стать клеточная терапия с применением СК, обеспечивающих иммуномодуляцию и трофическую поддержку на локальном и системном уровнях. Аутологичные МСК пациентов с БАС могут быть успешно изолированы без значительных побочных эффектов и размножены для клинического применения [19–21]. Однако даже если предположить, что трансплантированные МСК успешно достигнут терминальной стадии нейродифференцировки, новообразованные нейроны должны создавать функциональные синапсы, направлять отростки через ингибирующее микроокружение, интегрироваться в существующую нейронную сеть и восстанавливать нервно-мышечные соединения, прорастивая аксоны на большие расстояния. С другой стороны, культуры МСК крыс увеличивают синтез NGF, VEGF-A и BDNF (но не GDNF) при воздействии экстракта мозга крыс модели БАС на основе мутации SOD1 [22]. Таким образом, ожидаемый терапевтический эффект недифференцированных МСК для пациентов с БАС, как предполагается, обусловлен секрецией

протективных нейротрофических, противовоспалительных и/или иммуномодулирующих факторов, а не непосредственной заменой дегенерирующих нейронов.

Терапевтические инъекции МСК на моделях БАС грызунов (в основном на модели мутации G93A в гене супероксиддисмутазы SOD1) проводились различными путями, включая внутривенное, церебровентрикулярное, интрапаренхиматозное и внутрибрюшинное введение [23]. Интересно, что в большинстве случаев иммуносупрессия не была необходимой [24]. Интратекальная инъекция мышинных МСК привела к снижению нейровоспаления и увеличению выживаемости мышей SOD1 G93A. Важно отметить, что имплантированные МСК в данном исследовании также были способны трансдифференцироваться в астроциты [16]. В модели SOD1 комбинированное внутривенное и интрапаренхиматозное введение МСК также увеличивало продолжительность жизни крыс и улучшало их двигательную функцию [25]. Комплексное исследование механизмов нейропротективных эффектов МСК в модели БАС показало, что внутривенно введенные МСК мигрируют в ЦНС, понижают уровни цитокинов IL-1 β и TNF α и пролиферацию астроцитов и микроглии, нормализуют высвобождение глутамата, уменьшают окислительный стресс путем модуляции транскрипции генов металлотионеина, защищая, таким образом, нейроны от дегенерации [23].

Исследования с использованием донорских МСК человека также показали, что введение этих недифференцированных клеток в моделях БАС грызунов сдерживает гибель нейронов, уменьшает нейровоспаление и улучшает двигательную функцию [24, 26]. Так, согласно данным Voids с соавт. [27], интратекальное введение МСК человека мышам SOD1 приводит к снижению астроглиоза, увеличению уровня противовоспалительного цитокина IL-13 и замедляет гибель моторных нейронов. Производя цитокины и хемокины, МСК после внутривенной инъекции могут оказывать иммуномодулирующий эффект на системном уровне. Однако поскольку, как указано выше [7, 8], МСК реагируют на конкретный патологический контекст, их терапевтическая ценность может быть увеличена путем прямого введения в ЦНС. Это обеспечивает присутствие МСК в непосредственной близости от пораженных двигательных нейронов и окружающей глии и распространение трофических, защитных и иммуномодулирующих факторов в местном микроокружении, но в то же время оставляет открытым вопрос о возможности трансдифференцировки. Важно отметить, что доставка клеток в несколько областей спинного мозга может также способствовать улучшению исхода [28]. Большинство исследований на моделях БАС, показавших хорошие функциональные результаты на животных, связаны с интраспинальной трансплантацией СК [21, 24, 29, 30].

Эпилепсия также является одним из наиболее распространенных нервно-психических заболеваний, патогенез которого связан с локальным повреждением межнейронных связей головного мозга либо с генетически обусловленным гипервозбуждением, ведущим к нейродегенерации. Модели эпилепсии на грызунах оказались достаточно хорошо восприимчивы к терапии МСК. Так, клетки, меченные BrdU, после внутривенного введения локализовались в гиппокампе, способствуя значительному сокращению количества приступов, в то время как плотность нейронов увеличивалась [31]. Коста-Ферро с соавт. [12] также показали, что МСК из КМ после внутривенного введения стимулируют пролиферацию нейронов и приводят к сокращению частоты эпилептических приступов и их продолжительности, а также к снижению уровней провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 и IL-6, в то время как уровень противовоспалительного цитокина IL-10 увеличивается. Аутологичные МСК также сбалансировали экспрессию рецепторов аденозина и параметры электроэнцефалограммы при эпилепсии [9]. Имплантация МСК крысам с отключенной путем РНК-интерференции экспрессией Hes1 способствовала функциональному восстановлению при эпилепсии, причем (редкое наблюдение) трансдифференцировка МСК в ГАМК-эргические клетки коррелировала с уровнем их восстановления [15]. Предполагаемые механизмы действия МСК при эпилепсии, включая микровезикулы и паракринные факторы, подробно рассмотрены в обзоре Агади и Шетти [32]. По данным этой группы исследователей, внутривенно вводимые GFP-меченные МСК не прижились в травмированном гиппокампе, но, тем не менее, обеспечили (по-видимому, за счет растворимых факторов) значительную степень нейропротекции, в том числе снижение потери ГАМК-эргических интернейронов и концентра-

ции миелопероксидазы и повышение экспрессии генов, кодирующих противовоспалительные цитокины в гиппокампе [32]. Другой механизм действия МСК в ЦНС может включать ингибирование экспрессии субъединиц NMDAR и глутамат-индуцированных потоков кальция [33]. Лечение эпилепсии посредством фармацевтических препаратов эффективна у 65–70 % пациентов, что требует разработки новых лечебных технологий [34].

Обнадеживающие данные, полученные в опытах на животных, позволили задействовать аутологичные МСК в ряде клинических испытаний патологий нервной системы, в частности у пациентов с диагнозом «боковой амиотрофический склероз». В ряде исследований [35–39] ранее показана безопасность клинического использования недифференцированных аутологичных МСК при интратекальном и внутривенном введении пациентам. Отмечено некоторое замедление ухудшения показателей форсированной жизненной емкости легких и функционального состояния организма на краткосрочных интервалах у ряда пациентов, а также иммуномодуляторные эффекты – повышение IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 и IL-6 в цереброспинальной жидкости [39]. Тем не менее, в долгосрочном наблюдении (9 лет) после терапии недифференцированными МСК не выявлено значимых изменений в прогрессировании заболевания [36]. Полученные данные заставили задуматься о механизмах усиления эффективности клеточной терапии с применением МСК, в частности их нейрогенной индукции *in vitro* перед трансплантацией [40, 41].

Трансдифференцировка МСК в клетки нервной ткани *in vitro* является относительно недавним направлением. Результаты применения рядом исследователей [42–44] химических агентов либо специфических нейрогенных сред и ростовых факторов (EGF, bFGF, NGF, BDNF, ретиноевая кислота и др.) указывают на возможность запуска в МСК экспрессии генов, характерных для СК нервной ткани, и получения из МСК нейропредшественников с последующей дифференцировкой в различные типы нервной ткани (нейроны, астроциты и олигодендроциты) [6, 45–48]. Например, после инкубации МСК человека с комбинациями бета-меркаптоэтанола, ретиноевой кислоты и бета-гидроксианизола показана гиперэкспрессия ядерного антигена нейронов (NeuN), нейрон-специфичной эналазы (NSE), нестина (нейроассоциированного филамента), глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) и двух калиевых каналов [48]. Анализ экспрессии в нейроиндуцированных МСК маркеров, специфичных для нервной ткани, электрохимических свойств клеток и секреции нейротрансмиттеров позволяет сделать вывод о способности МСК-производных «нейронов» выполнять функции клеток нервной системы [44, 49, 50]. Ранее нами были предложены протоколы нейрогенной индукции МСК человека, показавшие активацию в МСК экспрессии таких маркеров нейрональных предшественников и ранних нейронов [42–44], как нестин и NSE, а также раннего олигодендроглиального маркера MBP. При увеличении времени инкубации в нейрогенной детектировался дополнительно сигнал экспрессии маркера постмитотических нейронов MAP-2 и олигодендроцитарный маркер dm-20. Иммунохимический анализ показал, что клетки МСК с нейрональной морфологией реагируют с антителами к раннему нейрональному маркеру β -III-тубулину [51, 52].

В то же время ряд авторов [53, 54] подвергают сомнению подобность радикального переключения СК мезодермального происхождения и получения на их основе полноценных нервных клеток, указывая на возможность ложноположительных результатов при попытках нейрогенной дифференцировки МСК. Так, отмечается атипичный характер роста МСК-производных «нейронов», «съезживание» клеток в стрессовых условиях, аберрантная локализация нейрональных маркеров (а также возможность присутствия их транскриптов на фоновом уровне в самих МСК [55]) и, что интересно, несовпадение дифференцированно экспрессированных генов между МСК-производными «нейронами» и клетками собственно нервной ткани (по данным *microarray*-анализа, 21 000 генов) [54]. В то же время анализ транскриптома МСК в других протоколах нейрогенной дифференцировки показал падение уровня экспрессии генов, участвующих в остео-, хондро- и адипогенезе, при повышении уровня экспрессии генов, задействованных в нейрогенезе [56, 57].

Одним из перспективных путей повышения эффективности нейрогенной дифференцировки СК является создание трехмерного (3D) микроокружения, имитирующего биологические свойства тканей организма. В качестве примеров материалов для создания 3D-матриц можно

привести матригель, коллаген, альгинат, фибрин, гиалуроновую кислоту и др. [58, 59]. Показано, что культивирование в 3D-матриксе способствует нейрогенной дифференцировке нервных и эмбриональных СК [60–62]. Химический состав, архитектура и биомеханика 3D-микроокружения совместно обеспечивают необходимые сигналы для дифференцировки и функционирования клеток. В частности, эксперименты по индукции МСК в 3D-матриксе показали, что направление дифференцировки может быть задано путем изменения структурных и биомеханических свойств матрикса [63]. Наши данные по нейроиндукции МСК человека в фибриновом 3D-матриксе демонстрируют генерацию клеток с разветвленной системой отростков и повышенную экспрессию нейромаркеров [52].

Еще одним подходом, способным обеспечить радикальное переключение и изменение характера функционирования клеток взрослого организма, является генно-инженерная модификация одним либо несколькими трансгенами, убедительным подтверждением чего являются, в частности, сообщения об индукции плюрипотентности терминально дифференцированных клеток [64]. Экспрессия посредством векторных конструкций известных регуляторов транскрипции, нейрогенных и нейротрофных факторов может способствовать повышению потенциала нейрогенной дифференцировки МСК. Факторы, влияние которых на развитие нервной системы достаточно хорошо изучено, могут как непосредственно обеспечивать дифференцировку СК в нейрональном направлении, так и способствовать повышению стрессоустойчивости клеток и стабилизировать их фенотип после трансплантации [65, 66].

Ряд генов-кандидатов уже продемонстрировали свою пригодность для модификации МСК с целью повышения их нейрогенного потенциала. Трансдукция МСК геном *BDNF* (необходим для поддержания жизнеспособности нейронов головного мозга, участвует в регуляции ответа на стрессовые раздражители) с последующим культивированием с ретиноевой кислотой позволила получить клетки, обладающие фенотипом и профилем экспрессии, соответствующим различным типам нервной ткани. Так, показана экспрессия маркера нейро-прогениторов нестина, маркера нейронов NeuN, маркера олигодендроцитов O4 и маркера астроцитов GFAP; подтверждены и электрохимические свойства трансгенных клеток [67]. МСК, трансдуцированные геном *NTF3* (кодирует нейротрофин NT-3, участвующий в обеспечении как развития нейронов в эмбриогенезе, так и функционирования взрослой нервной системы), демонстрировали повышенную экспрессию нейрональных маркеров NF и MAP-2, особенно выраженную в присутствии ретиноевой кислоты. Сочетание трансгена *NTF3* и ретиноевой кислоты позволило также добиться экспрессии в 22 % клеток PSD95 – маркера синаптогенеза, что может свидетельствовать о терминальной дифференцировке МСК в нейроны [68].

Нейрогенный потенциал плеiotропного транскрипта *noggin*, видимо, обусловлен тем, что последний является ингибитором сигнальных молекул семейства TGF- β , в частности BMP-4. *Noggin* участвует в формировании морфогенных градиентов и развитии нервной системы в эмбриогенезе, стимулирует нейрогенез и подавляет глиальную дифференцировку. Трансфекция МСК геном *noggin* приводила к формированию нейросфероподобных клеточных агрегатов, которые при высаживании на орнитин/фибронектиновое покрытие преобразовывались в клетки нейрональной морфологии, при этом 50 % из них экспрессировали постмитотический маркер нейронов MAP-2 [66]. Сайленсинг *Hes1* путем РНК-интерференции стимулировал дифференцировку МСК в ГАМК-эргические нейроноподобные клетки [15]. Трансдукция МСК генами *RB* и *RB2/p130*, участвующими в контроле клеточного цикла и нейрогенезе [69, 70], также показала их способность к стимуляции нейрогенной дифференцировки, что подтверждалось повышением экспрессии нейрон-специфичной энлазы NSE и нейрофиламентов. Интересно, что трансген *RB2/p130* стимулировал нейрогенез в целом, тогда как *RB* – преимущественно холинэргическую дифференцировку [71]. МСК, трансфицированные геном *NICD* (внутриклеточный домен Notch), преобразовывались в нейроноподобные клетки при участии ростовых факторов bFGF, CNTF и фторсколина в течение 5 дней [65]. Инкубированные таким образом трансгенные клетки были постмитотическими, демонстрировали характерные электрохимические свойства и экспрессию маркера MAP-2, а при дальнейшем воздействии нейротрофного фактора GDNF генерировали тирозиназа-положительные клетки, способные к секреции допамина [65].

Учитывая сложность полноценной функциональной интеграции нейродифференцированных МСК в существующие нейронные сети, более практически ориентированный подход к трансдифференцировке МСК подразумевает индукцию в них конкретных терапевтически релевантных секретлируемых агентов. Так, двухступенчатый протокол нейрогенной дифференцировки с применением специализированных культуральных сред позволил запрограммировать МСК на секрецию нейротрофных факторов BDNF и GDNF [40,41], играющих важную роль в защите и выживании нейронов. Эти нейроиндуцированные МСК (торговая марка NurOwn™, производитель BrainStorm Cellular Therapeutics) показали также экспрессию нейрональных и астроцитарных маркеров. Они обеспечивали повышенную защиту нейронов в культуре и в моделях травмы и нейродегенеративных заболеваний на подопытных животных [41, 72, 73]. СК из жировой ткани также были дифференцированы в нейроноподобные клетки с применением селегилина и показали повышенную секрецию нейротрофных факторов [14].

Продуцирующие нейротрофные факторы, предифференцированные МСК от BrainStorm Cellular Therapeutics, были имплантированы внутримышечно и/или интратекально пациентам с БАС, что стало редким и важным примером клинической трансляции нейрогенно индуцированных МСК человека. По результатам фазы 1/2 и 2а клинических испытаний, скорость прогрессии по тестам форсированной жизненной емкости легких (FVC) и ALSFRS-R у пациентов с БАС были снижены в течение 6 мес. после интратекального или комбинированного интратекального + внутримышечного введения нейроиндуцированных МСК [74].

Наши протоколы [51, 52], включая молекулярно-генетический анализ результирующего фенотипа по маркерам нестин и NSE, вошли в утвержденный в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» регламент на производство культуры аутологичных МСК костного мозга для клеточной терапии и были применены в клинических экспериментальных методах терапии пациентов с диагнозами «боковой амиотрофический склероз» [75] и «эпилепсия» [76] в медицинских учреждениях Республики Беларусь.

Клинические эксперименты по терапии БАС с применением нейроиндуцированных МСК проводились командой Ю. Н. Рушкевич в Республиканском научно-практическом центре неврологии и нейрохирургии (г. Минск, Беларусь) [75]. Пациенты с БАС, включенные в исследование, находились на стационарном лечении. Группу терапии составили 10 пациентов, получавших инъекции аутологичными МСК, контрольную группу составили 15 пациентов, получавших стандартную симптоматическую терапию (нейрометаболические препараты, антидепрессанты, антиконвульсанты и т. д.). Курс терапии 10 пациентов с диагнозом «БАС» состоял из двух этапов: 1) внутривенное введение недифференцированных аутологичных МСК в дозе $(42-102) \cdot 10^6$ клеток; 2) через 6–7 сут введение нейроиндуцированных аутологичных МСК, протестированных предварительно методом RT-PCR на увеличение уровня экспрессии нейромаркеров NSE и nestin, в субарахноидальное пространство в промежутке L3–L4 в дозе $(5,0-9,7) \cdot 10^6$ клеток. Серьезных побочных реакций или осложнений при проведении клеточной терапии не выявлено.

При динамическом наблюдении за пациентами прогрессирование БАС зарегистрировано в обеих группах в виде нарастания степени парезов, вовлечения в патологический процесс новых регионов, снижения функциональных возможностей пациентов. Степень тяжести парезов увеличивалась в течение срока наблюдения в обеих группах. Тем не менее выявлены значимые различия результатов конечных осмотров: среднее количество баллов по шкале ALSFRSR в группе клеточной терапии составило 34 (29; 37), в контрольной – 16 (12; 23) ($p < 0,001$); по шкале Карновского в основной группе – 70 (50; 70) %, в контрольной группе – 20 (20; 30) % ($p < 0,001$) (*U*-критерий Манна–Уитни) [75]. Динамика коэффициента темпа прогрессирования заболевания клинической симптоматики и снижения функциональных возможностей пациентов также была достоверно лучше в группе клеточной терапии по сравнению с контрольной. Полученные данные указывают на более медленное снижение функциональных возможностей пациентов в группе клеточной терапии по сравнению с контрольной группой. Вовлечение бульбарной мускулатуры (как симптома прогрессирования БАС, приводящего к возникновению аспирационного синдрома) в виде замедления речи, дизартрии, дисфагии, дисфонии, гипотрофии языка, повышения или угнетения

глоточного рефлекса в период проведения исследования отмечено у 3 (30 %) пациентов группы клеточной терапии и у всех (100 %) пациентов контрольной группы ($\chi^2 = 11,32$; $p = 0,008$) [75]. Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что клеточная терапия аутологичными интактными и нейроиндуцированными МСК пациентов с БАС безопасна и способствует снижению темпа прогрессирования заболевания, более позднему присоединению бульбарно-псевдобульбарного синдрома и дыхательных нарушений, что улучшает качество жизни пациента. Тем не менее, небольшое количество и краткий срок наблюдений (1 год) не позволяют делать однозначных выводов в отношении долгосрочных прогнозов течения заболевания.

Клинические эксперименты по терапии эпилепсии с применением нейроиндуцированных МСК впервые в мире проводились командой Ф. П. Хлебоказова на базе РНПЦ психического здоровья (г. Минск, Беларусь) [76]. Основанием для проведения клеточной терапии пациентам с диагнозом «эпилепсия» являлась неэффективность проводимой ранее фармакотерапии. Группу терапии составили 10 пациентов, получавших инъекции аутологичными МСК согласно приведенной выше двухфазной схеме (внутривенное введение недифференцированных аутологичных МСК и через 5–7 сут введение нейроиндуцированных МСК в спинномозговой канал). Безопасность проводимых процедур, связанных с проведением клеточной терапии, была подтверждена у всех пациентов с эпилепсией, побочных эффектов или аллергических реакций зафиксировано не было. При анализе тяжести и частоты приступов до и после лечения при сроках наблюдения от 3 до 17 мес. у 6 из 10 пациентов отмечалось улучшение, выражающееся уменьшением частоты приступов либо трансформацией их в более легкую форму. Психологические исследования после введения МСК показали положительную динамику по когнитивным функциям у 1 пациента, снижение уровня ситуативной тревожности – у 6, повышение до умеренно-выраженного – у 1. Динамика изменения электроэнцефалограммы была положительной [76].

Полученные предварительные данные подтверждают безопасность и перспективность использования аутологичных, в том числе нейроиндуцированных, МСК человека для терапии пациентов с диагнозами «БАС» и «эпилепсия». Дополнительные исследования необходимы для более четких показаний к трансплантации СК и нейроиндукции (форма и степень тяжести заболевания, сопутствующие нарушения), определения оптимального количества курсов клеточной терапии, а также для выявления долгосрочных эффектов данной экспериментальной технологии лечения.

Список использованной литературы

1. Bjorklund, A. Neurobiology. Better cells for brain repair / A. Bjorklund // *Nature*. – 1993. – Vol. 362. – P. 414–415.
2. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients / O. Y. Bang [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2005. – Vol. 57. – P. 874–882.
3. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium / D. G. Katritsis [et al.] // *Catheter. Cardiovasc. Interv.* – 2005. – Vol. 65. – P. 321–329.
4. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH) / O. N. Koc [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2002. – Vol. 30. – P. 215–222.
5. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs / A. J. Friedenstein [et al.] // *Exp. Hematol.* – 1976. – Vol. 4. – P. 267–274.
6. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition / N. R. Blondheim [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2006. – Vol. 15. – P. 141–164.
7. Xenograft of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly as a potential therapy for rat pilocarpine-induced epilepsy / P. Y. Huang [et al.] // *Brain Behav. Immun.* – 2015.
8. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord / C. C. Yang [et al.] // *PLoS. One.* – 2008. – Vol. 3. – P. e3336.
9. The imbalanced expression of adenosine receptors in an epilepsy model corrected using targeted mesenchymal stem cell transplantation / K. Huicong [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 48. – P. 921–930.
10. Early transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes neuroprotection and modulation of inflammation after status epilepticus in mice by paracrine mechanisms / M. M. Leal [et al.] // *Neurochem. Res.* – 2014. – Vol. 39. – P. 259–268.
11. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy / Z. S. Costa-Ferro [et al.] // *Seizure.* – 2010. – Vol. 19. – P. 84–92.

12. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats / Z. S. Costa-Ferro [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2012. – Vol. 46. – P. 302–313.
13. Antiepileptic and neuroprotective effects of human umbilical cord blood mononuclear cells in a pilocarpine-induced epilepsy model / Z. S. Costa-Ferro [et al.] // *Cytotechnology.* – 2014. – Vol. 66. – P. 193–199.
14. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline / A. Abdanipour [et al.] // *Iran Biomed. J.* – 2011. – Vol. 15. – P. 113–121.
15. Genetically engineered bone marrow mesenchymal stem cells improve functional outcome in a rat model of epilepsy / Q. Long [et al.] // *Brain Res.* – 2013. – Vol. 1532. – P. 1–13.
16. Chimerization of astroglial population in the lumbar spinal cord after mesenchymal stem cell transplantation prolongs survival in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis / C. Boucherie [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2009. – Vol. 87. – P. 2034–2046.
17. Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study / E. Pupillo [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2014. – Vol. 75. – P. 287–297.
18. Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study / A. Al-Chalabi [et al.] // *Lancet Neurol.* – 2014. – Vol. 13. – P. 1108–1113.
19. Cell-replacement therapy with stem cells in neurodegenerative diseases / V. Silani [et al.] // *Curr. Neurovasc. Res.* – 2004. – Vol. 1. – P. 283–289.
20. The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS / G. M. Thomsen [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2014. – Vol. 262. – Pt B. – P. 127–137.
21. Transplantation of mesenchymal stem cells in ALS / L. Mazzini [et al.] // *Prog. Brain Res.* – 2012. – Vol. 201. – P. 333–359.
22. Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells / C. Nicaise [et al.] // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 37. – P. 179–188.
23. Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis / A. Uccelli [et al.] // *Mol. Med.* – 2012. – Vol. 18. – P. 794–804.
24. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis / A. Vercelli [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2008. – Vol. 31. – P. 395–405.
25. Mesenchymal stromal cells prolong the lifespan in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis / S. Forostyak [et al.] // *Cytotherapy.* – 2011. – Vol. 13. – P. 1036–1046.
26. Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice / C. P. Zhao [et al.] // *Cytotherapy.* – 2007. – Vol. 9. – P. 414–426.
27. Human mesenchymal stromal cell transplantation modulates neuroinflammatory milieu in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis / M. Boido [et al.] // *Cytotherapy.* – 2014. – Vol. 16. – P. 1059–1072.
28. Dual transplantation of human neural stem cells into cervical and lumbar cord ameliorates motor neuron disease in SOD1 transgenic rats / L. Xu [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2011. – Vol. 494. – P. 222–226.
29. Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTERA 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis / S. Garbuzova-Davis [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2002. – Vol. 174. – P. 169–180.
30. Sertoli cells improve survival of motor neurons in SOD1 transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis / R. Hemendinger [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2005. – Vol. 196. – P. 235–243.
31. Improvement of the pilocarpine epilepsy model in rat using bone marrow stromal cell therapy / A. Abdanipour [et al.] // *Neurol. Res.* – 2011. – Vol. 33. – P. 625–632.
32. Concise Review: Prospects of Bone Marrow Mononuclear Cells and Mesenchymal Stem Cells for Treating Status Epilepticus and Chronic Epilepsy / S. Agadi [et al.] // *Stem Cells.* – 2015. – Vol. 33. – P. 2093–2103.
33. Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function / A. Voulgari-Kokota [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2012. – Vol. 236. – P. 161–170.
34. Epilepsy: Novel therapeutic targets / A. P. Anovadiya [et al.] // *J. Pharmacol. Pharmacother.* – 2012. – Vol. 3. – P. 112–117.
35. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis / L. Mazzini [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2008. – Vol. 265. – P. 78–83.
36. Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study / L. Mazzini [et al.] // *Cytotherapy.* – 2012. – Vol. 14. – P. 56–60.
37. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis / D. Karussis [et al.] // *Arch. Neurol.* – 2010. – Vol. 67. – P. 1187–1194.
38. Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study / M. Blanquer [et al.] // *Stem Cells.* – 2012. – Vol. 30. – P. 1277–1285.
39. Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis / K. W. Oh [et al.] // *Stem Cells Transl. Med.* – 2015. – Vol. 4. – P. 590–597.
40. Migration of neurotrophic factors-secreting mesenchymal stem cells toward a quinolinic acid lesion as viewed by magnetic resonance imaging / O. Sadan [et al.] // *Stem Cells.* – 2008. – Vol. 26. – P. 2542–2551.

41. Differentiated mesenchymal stem cells for sciatic nerve injury / M. Dadon-Nachum [et al.] // *Stem Cell Rev.* – 2011. – Vol. 7. – P. 664–671.
42. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells / A. Hermann [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117. – P. 4411–4422.
43. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells / S. Kim [et al.] // *Brain Res.* – 2006. – Vol. 1123. – P. 27–33.
44. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells / X. Long [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2005. – Vol. 14. – P. 65–69.
45. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? / P. Lu [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – Vol. 77. – P. 174–191.
46. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro / J. Sanchez-Ramos [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 247–256.
47. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons / D. Woodbury [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2000. – Vol. 61. – P. 364–370.
48. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types / K. Mareschi [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2006. – Vol. 34. – P. 1563–1572.
49. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos / C. D. Keene [et al.] // *Cell Transplant.* – 2003. – Vol. 12. – P. 201–213.
50. Neural induction of adult bone marrow and umbilical cord stem cells / X. R. Ortiz-Gonzalez [et al.] // *Curr. Neurovasc. Res.* – 2004. – Vol. 1. – P. 207–213.
51. Plasticity of human mesenchymal stem cell phenotype and expression profile under neurogenic conditions / A. V. Shakhbazau [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 147. – P. 513–516.
52. Neurogenic induction of human mesenchymal stem cells in fibrin 3D matrix / A. V. Shakhbazau [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 150. – P. 547–550.
53. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties / Y. Chen [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2006. – Vol. 63. – P. 1649–1657.
54. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray / N. Bertani [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118. – P. 3925–3936.
55. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation / J. Deng [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24. – P. 1054–1064.
56. Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells / T. Tondreau [et al.] // *BMC. Genomics.* – 2008. – Vol. 9. – P. 166.
57. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC) – a preliminary study using microarray analysis / S. Yamaguchi [et al.] // *Brain Res.* – 2006. – Vol. 1087. – P. 15–27.
58. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification / A. J. Engler [et al.] // *Cell.* – 2006. – Vol. 126. – P. 677–689.
59. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering / G. Jin [et al.] // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7. – P. 3113–3122.
60. Biodegradable fibrous scaffolds with tunable properties formed from photo-cross-linkable poly(glycerol sebacate) / J. Ifkovits L. [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2009. – Vol. 1. – P. 1878–1886.
61. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation / J. A. Burdick [et al.] // *Tissue Eng Part A.* – 2009. – Vol. 15. – P. 205–219.
62. Vascular differentiation of bone marrow stem cells is directed by a tunable three-dimensional matrix / G. Zhang [et al.] // *Acta Biomater.* – 2010. – Vol. 6. – P. 3395–3403.
63. Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation / A. J. Engler [et al.] // *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* – 2007. – Vol. 7. – P. 335.
64. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors / K. Takahashi [et al.] // *Cell.* – 2007. – Vol. 131. – P. 861–872.
65. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation / M. Dezawa [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 113. – P. 1701–1710.
66. Brain from bone: efficient “meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent / J. Kohyama [et al.] // *Differentiation.* – 2001. – Vol. 68. – P. 235–244.
67. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection / L. X. Zhao [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2004. – Vol. 190. – P. 396–406.
68. Combination of adenoviral vector-mediated neurotrophin-3 gene transfer and retinoic acid promotes adult bone marrow cells to differentiate into neuronal phenotypes / W. Zhang [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2006. – Vol. 408. – P. 98–103.
69. Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene / J. E. LeCouter [et al.] // *Development.* – 1998. – Vol. 125. – P. 4669–4679.
70. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis / E. Y. Lee [et al.] // *Nature.* – 1992. – Vol. 359. – P. 288–294.

71. RB and RB2/p130 genes demonstrate both specific and overlapping functions during the early steps of in vitro neural differentiation of marrow stromal stem cells / F. P. Jori [et al.] // Cell Death. Differ. – 2005. – Vol. 12. – P. 65–77.
72. Protective effects of neurotrophic factor-secreting cells in a 6-OHDA rat model of Parkinson disease / O. Sadan [et al.] // Stem Cells Dev. – 2009. – Vol. 18. – P. 1179–1190.
73. Adult neurotrophic factor-secreting stem cells: a potential novel therapy for neurodegenerative diseases / O. Sadan [et al.] // Isr. Med. Assoc. J. – 2009. – Vol. 11. – P. 201–204.
74. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials / P. Petrou [et al.] // JAMA Neurol. – 2016. – Vol. 73 (3). – P. 337–344.
75. The Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells for Cell Therapy of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in Belarus / Y. N. Rushkevich [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. – 2015. – Vol. 159. – P. 576–581.
76. Our experience in application of autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for therapy of patients with symptomatic epilepsy / F. Hlebokazov [et al.] // Epilepsy and paroxysmal conditions. – 2014. – Vol. 1. – P. 6–14.

Поступила в редакцию 09.03.2016

УДК 577.1:613.81.616-008.9

П. С. ПРОНЬКО

ВЛИЯНИЕ ПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ НА РИСК РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

*Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Беларусь,
e-mail: office@biochem.basnet.by*

По данным мета-анализа проспективных исследований, злоупотребление алкоголем увеличивает риск развития метаболического синдрома, тогда как очень низкое его потребление ассоциируется со сниженным риском. Потребление алкоголя в диапазоне от низкого до умеренного снижает риск развития артериальной гипертензии у женщин и увеличивает риск данного заболевания у мужчин. Увеличение приема алкоголя связано со статистически достоверным, но количественно небольшим увеличением веса тела у мужчин. Легкое и умеренное потребление алкоголя снижает риск развития сахарного диабета второго типа у мужчин и женщин, а злоупотребление является опасным.

Ключевые слова: метаболический синдром, употребление алкоголя, артериальная гипертензия, избыточный вес, сахарный диабет, толерантность к глюкозе.

P. S. PRONKO

EFFECT OF ALCOHOL CONSUMPTION ON THE RISK OF METABOLIC SYNDROME

*Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Belarus, e-mail: office@biochem.basnet.by*

The meta-analysis of prospective studies suggested that heavy alcohol consumption might be associated with an increased risk of metabolic syndrome while very light alcohol consumption seemed to be associated with a reduced risk of metabolic syndrome. Light-to-moderate alcohol consumption decreased the hypertension risk in women and increased the risk in men. Increased uptake of alcohol is related to a statistically significant but quantitatively small increase in the body weight of men. A dual relationship exists between alcohol consumption and diabetes mellitus. Light-to-moderate drinking may be beneficial while heavy drinking is detrimental.

Keywords: metabolic syndrome, alcohol consumption, arterial hypertension, excessive weight, diabetes mellitus, tolerance to glucose.

Введение. В последние два десятилетия заметно возрос интерес исследователей и клиницистов к метаболическому синдрому (МС). Критерии МС, опубликованные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 1999 г., содержат указания на наличие артериальной гипертензии, дислипидемии, микроальбуминемии, центрального/висцерального ожирения и сахарного диабета второго типа либо иных нарушений гликемии. В последние годы с МС ассоциируют также неалкогольные заболевания печени группы стеатогепатитов. Наличие широкого круга вопросов, по которым пересекаются проблемы потребления алкоголя и компоненты МС, делает их изучение актуальным. Алкоголь оказывает множество эффектов на энергетический метаболизм, обмен липидов и углеводов, является источником энергии и агентом, обладающим собственными фармакологическими свойствами. Эпидемиологические данные свидетельствуют, что потребление алкоголя связано с наличием МС или риском его развития, однако данные по этой тематике изменчивые и противоречивые. Представляет интерес изучение вопроса о положительном вкладе употребления алкоголя с низким риском для здоровья на заболеваемость и смертность при отдельных заболеваниях и в различных группах населения.

Изучение различных аспектов, способствующих развитию МС, является актуальным в связи с тем, что сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место среди причин смерти в индустриально развитых странах, в том числе и в Республике Беларусь. По данным ВОЗ, от сердечно-сосудистых заболеваний ежегодно умирают 17 млн человек, что составляет не менее 1/3 всех смертей. В Республике Беларусь сохраняются тенденции к увеличению числа лиц с избыточной массой тела и нарушениями метаболических параметров [1].

Злоупотребление алкоголем – также один из ведущих рисков для здоровья человечества. По данным ВОЗ, алкоголь является причиной более чем 60 типов болезней и травм, приводящих к смерти приблизительно 2,5 млн человек каждый год, что составляет 4 % от числа умерших во всем мире. Злоупотребление алкоголем – ведущий фактор риска смерти у молодых мужчин в возрасте 15–59 лет. Выделяют три основных механизма, прямо приводящих к болезням и травмам: 1) токсические, метаболические и другие эффекты алкоголя на органы и ткани; 2) состояние опьянения; 3) зависимость от алкоголя [2].

В Европе средний уровень потребления алкоголя более чем в 2 раза превышает глобальные средние величины, в 2009 г. он составил в Европейском союзе (ЕС) 12,5 л абсолютного алкоголя. В ЕС в 2009 г. 15 % мужчин выпивали более 60 г чистого алкоголя, что позволяет отнести их к группе с высоким или очень высоким риском для здоровья. Среди женщин 7,7 % имели тот же уровень риска, употребляя более 40 г алкоголя в день [3].

Алкогольная зависимость и злоупотребление алкоголем наносят серьезный вред физическому и психическому здоровью населения и в Республике Беларусь. Согласно данным Национального статистического комитета, совокупный уровень продажи алкоголя в Беларуси в период с 1995 по 2012 г. вырос почти в 2 раза: от 6,7 до 11,97 л абсолютного алкоголя на душу населения. Уровень продаж алкоголя на душу населения в 2014 г. составил 10,47 л, что превышает пороговый уровень потребления алкоголя в 8 л, установленный экспертами ВОЗ. По оценке ВОЗ [4], по уровню общего потребления алкоголя (15,13 л), включающему неучтенное статистикой потребление, Республика Беларусь находится на 10-м месте в мире. Число лиц с зависимостью от алкоголя, состоящих на диспансерном учете в наркологических диспансерах на 1 октября 2013 г. составляло 175 тыс. человек. К их числу следует добавить еще 86 тыс. человек, которые находятся в группе профилактического учета как употребляющие алкоголь с вредными последствиями.

По данным ВОЗ, потребление алкоголя является причиной от 20 до 50 % случаев цирроза печени, эпилепсии, отравлений, дорожных аварий, случаев насильственных действий и различных типов рака [5]. В Республике Беларусь алкоголь играет важную роль в смертности населения от внешних причин. Смертность от травм и отравлений алкоголем вышла на 3-е место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний.

Для оценки количества употребляемого алкоголя обычно используют показатели потребления, пересчитанные на граммы абсолютного алкоголя. Доза спиртного может быть рассчитана и в порциях. В нормальных условиях скорость метаболизма этанола у человека равна примерно 120–150 мг/кг массы/ч. Скорость элиминации этанола из крови лежит в пределах 100–300 мг/л/ч, что эквивалентно 6–9 г абсолютного алкоголя в 1 ч для человека среднего веса. Эту величину считают стандартной порцией алкоголя, ВОЗ оценивает ее как 10 г алкоголя. Для оценки эпидемиологических данных введены категории потребления алкоголя (см. таблицу).

К потреблению с низким риском для здоровья относится уровень до 40 г в день у мужчин и до 20 г у женщин. Эпизодическое злоупотребление алкоголем – периодическое употребление хотя бы 60 г алкоголя (уровень 2).

Классификация уровней употребления алкоголя

Категория лиц, употребляющих алкоголь	Потребление алкоголя в день	
	Мужчины	Женщины
Абстинент	0	0
Уровень 1. Низкий риск для здоровья	>0–40 г	>0–20 г
Уровень 2. Эпизодическое злоупотребление алкоголем	>40–60 г	>20–40 г
Уровень 3. Потребление с высоким риском для здоровья	>60 г	>40 г

К потреблению с высоким риском для здоровья (см. таблицу, уровень 3) или злоупотреблению алкоголем относят прием за 1 раз количества алкоголя, эквивалентного 1 бутылке вина, 5 бутылкам пива или 5 и более стандартным рюмкам водки.

Понятие «употребления алкоголя с вредными последствиями» (или злоупотребление алкоголем) – это массивное употребление спиртного, которое приводит к ухудшению здоровья, социальному снижению и дезадаптации, симптомам соматических изменений со стороны печени, головного мозга, сердечно-сосудистой системы, изменениям личности, депрессии и физической зависимости [2, 6]. Выделяют способ употребления алкоголя, когда человек доводит себя до состояния опьянения (тяжелое пьянство), которое напрямую связано с опасностью травмирования и развитием сердечно-сосудистых заболеваний, а также их исходом.

Метаболический синдром и алкоголь. Имеются данные эпидемиологических наблюдений, что злоупотребление алкоголем связано с увеличением риска развития МС. В проспективном исследовании в Южной Корее на большом количестве испытуемых (3833 мужчины и женщины) изучена ассоциация между потреблением алкоголя и проявлениями МС [7]. Случаи МС диагностировались во время 4-летнего наблюдения за их здоровьем. Сравнение лиц, не употребляющих алкоголь, с группами лиц с очень низким потреблением (от 0,1 до 5 г алкоголя в день (г/день), низким потреблением (от 5,1 до 15 г/день), умеренно пьющих (от 15,1 до 30,0 г/день) и злоупотребляющих алкоголем (больше 30 г/день) позволило сделать вывод, что злоупотребление алкоголем, особенно среди употребляющих крепкие спиртные напитки, связано с увеличенным риском МС и влиянием на все его компоненты.

Другое исследование было посвящено выявлению связи между потреблением алкоголя и МС и зависимостей, связанных с полом и дозой потребления алкоголя, с помощью мета-анализа данных, приведенных в 14 публикациях [8]. Результаты показали, что потребление алкоголя в дозах менее 40 г/день у мужчин и 20 г/день у женщин существенно уменьшает превалирование МС. Положительный метаболический эффект ограничен уровнем потребления алкоголя менее 20 г/день у женщин и 40 г/день у мужчин, что считается употреблением алкоголя с низким риском для здоровья. Эти данные подтверждают существующие рекомендации относительно потребления алкоголя у здоровых людей.

В еще одном исследовании в мета-анализ были включены 6 проспективных исследований, в которых участвовали 28 862 испытуемых с 3305 случаями МС. При первичном анализе сравнение с непьющими лицами или потребляющими на низком уровне было ассоциировано со сниженным риском МС, а тяжелое пьянство – с увеличенным риском МС [9].

Алкоголь и сердечно-сосудистые заболевания. Взаимоотношения между потреблением алкоголя и сердечно-сосудистыми заболеваниями являются сложными. Низкое и умеренное потребление алкоголя ассоциировалось с пользой для здоровья при сердечно-сосудистых заболеваниях и улучшало их исход в клинических наблюдениях [10, 11] и экспериментальных (интервенционных) исследованиях на пациентах [12], однако механизмы этих эффектов пока остаются неясными. Прием алкоголя в низких и умеренных дозах приводит к уменьшению риска заболеваемости и смертности в отношении ишемической болезни сердца и ишемического инсульта по сравнению с теми, кто полностью воздерживается от приема алкоголя. Однако благоприятное кардиопротекторное влияние исчезает при эпизодах тяжелого пьянства [13–15]. На основе мета-анализа показано, что в среднем лица, относящиеся к легким и умеренным потребителям алкоголя, не испытывали протекторного эффекта, если они сообщали по крайней мере об одном эпизоде тяжелого пьянства в течение месяца [15]. Более того, вне зависимости от характера потребления алкоголя он оказывает неблагоприятный эффект при артериальной гипертензии, сердечных аритмиях и геморрагическом инсульте.

Злоупотребление алкоголем увеличивает риск артериальной гипертензии, но данные о взаимосвязи между легким и умеренным потреблением алкоголя и развитием артериальной гипертензии остаются противоречивыми. В проспективном исследовании проведено наблюдение за 28 848 женщинами (проект Women's Health Study) и 13 455 мужчинами (проект Physicians' Health Study), которые исходно не имели гипертензии, сердечно-сосудистых заболеваний и рака [16]. В течение 10,9 и 21,8 года наблюдения у 8680 женщин и 6012 мужчин развилась гипертензия.

У женщин была найдена J-образная форма ассоциации между потреблением этанола и гипертензией. Добавление потенциальных интермедиатов (индекс массы тела, диабет и высокий холестерол) ослабило пользу алкоголя в диапазоне от низкого до умеренного потребления и усилило отрицательный эффект от злоупотребления алкоголем. У мужчин потребление алкоголя было положительно и существенно связано с риском развития гипертензии, ассоциация сохранялась после многофакторной корректировки. В целом потребление алкоголя в диапазоне от низкого до умеренного снижало риск гипертензии у женщин и увеличивало этот риск у мужчин. Порог, выше которого алкоголь становился опасным для риска развития гипертензии, выявлен на уровне 4 стандартных порций алкоголя у женщин против низкого уровня в 1 стандартную порцию алкоголя у мужчин.

Потребление алкоголя от легкого до умеренного может быть полезным для сердечно-сосудистой системы, оказывая влияние посредством улучшения профиля липидов индивидуумов, включая эффекты на уровне липопротеинов высокой плотности-с (ЛПВП-с), концентрации частиц ЛПВП и субфракций ЛПВП-с [17]. Взаимоотношение между потреблением алкоголя от легкого до умеренного и уровнем липопротеинов низкой плотности-с (ЛПНП-с) или триглицеридами менее ясно: сообщается о снижении уровней ЛПНП-с и триглицеридов [18–23], отсутствии эффекта [12] или ухудшении липидного профиля крови [21].

В исследованиях, выполненных на пациентах с МС, была доказана польза от регулярного низкого и умеренного приема алкоголя, заключающаяся в антисклеротическом эффекте, повышении уровня холестерина ЛПВП, снижении концентраций триглицеридов и общего холестерина, аполипопротеина В, ЛПНП, а также снижении артериального давления [24, 25]. Тем не менее, заслуживает внимания факт, что такие эффекты широко варьируются в соответствии с уровнем потребления алкоголя. Польза от приема алкоголя найдена только тогда, когда принимались малые дозы алкоголя. При хорошем контроле концентрации сывороточных триглицеридов и глюкозы крови алкоголь проявляет свои положительные эффекты при дозе 20–30 г/день и менее у мужчин и 10–20 г/день и менее у женщин. Сообщалось, что более высокие уровни приема алкоголя вызывают повышение уровней триглицеридов, глюкозы крови и артериального давления пропорционально увеличению его потребления.

В недавно выполненном исследовании был использован подход с Менделевской рандомизацией, чтобы оценить, влияет ли потребление алкоголя на уровни липидов. В анализ были включены 10 893 жителя США европейского происхождения из научного исследования риска атеросклероза в обществе (ARIC) [26]. Это исследование подтверждает причинную роль регулярного низкого и умеренного потребления алкоголя в повышении ЛПВП2-с, снижении концентрации триглицеридов, общего холестерина и ЛПНП-с. Приведены новые данные о том, что потребление алкоголя на уровнях от низкого до умеренного снижает содержание аполипопротеина В и ЛПНП-с среди американцев европейского происхождения. Тем не менее, учитывая нелинейность эффекта от приема алкоголя даже в диапазоне доз от низких до умеренных, увеличение потребления не всегда приносило большую пользу [26]. Ассоциация между потреблением алкоголя и возросшим уровнем ЛПВП2-с найдена в клинических наблюдениях [17]. Более раннее исследование с использованием Менделевской рандомизации также подтверждает, что причиной снижения концентрации триглицеридов является потребление алкоголя [27]. Взаимосвязь между приемом алкоголя и снижением концентрации ЛПНП-с согласуется и с результатами двух экспериментальных работ с использованием красного вина [22, 23].

Излишний вес и алкоголь. Этанол является нутриентом и имеет калорийную ценность: 7 ккал/г (углеводы и белки продуцируют 4 ккал/г, а жиры дают 9 ккал/г). Алкоголь не запасается в организме и остается в тканевой воде до элиминации, в отличие от других метаболитов, которые могут запасаться и расходоваться по мере необходимости, как, например, углеводы (гликоген в печени и мышцах) и жиры (триглицериды в жировой ткани и печени). В то время как метаболизм основных нутриентов находится под контролем гормонов, таких как инсулин/глюкагон, лептин, катехоламины, гормоны щитовидной железы, имеется незначительная гормональная регуляция, влияющая на скорость элиминации этанола. В связи с этим в печени происходят значительные метаболические нарушения при окислении этанола во время его элиминации из ор-

ганизма [28]. Важно отметить, что калории, полученные из алкоголя, производятся в избытке по сравнению с обычными нутриентами, поскольку алкоголь окисляется в первую очередь по сравнению с другими питательными веществами [29, 30]. Кроме этанола некоторые алкогольные напитки могут содержать углеводы и небольшие количества белков и аминокислот, к ним относятся ферментированные алкогольные продукты, такие как пиво, саке и сладкие вина. Эти спиртные напитки содержат больше калорий, чем дистиллированные напитки при том же содержании спирта. Например, средняя бутылка пива объемом 500 мл и двойная порция водки (виски) объемом 60 мл содержат равное количество алкоголя (20 г). Однако между ними есть большая разница по калориям: пиво – 210 ккал, водка или виски – 140 ккал [31]. Поскольку алкоголики могут выпить от 200 до 300 г этанола в день, что эквивалентно 1400–2100 ккал, употребление нормальных нутриентов у них обычно значительно снижается.

У лиц с ожирением, которые употребляют значительные количества алкоголя, возможно развитие МС, поскольку вклад алкоголя может составить от 6 до 10 % от общего количества потребленных калорий. В октябре 2014 г. в Великобритании опрос 2117 взрослых лиц показал, что 80 % опрошенных не знают о содержании калорий в алкогольных напитках и не осведомлены о том, что алкоголь вносит вклад в общую калорийность их рациона [32]. Согласно требованиям ЕС, с 2011 г. на упакованных продуктах указывается их состав и содержание энергии (калорий), однако на алкогольные напитки эти требования не распространяются.

С учетом того, что алкогольные напитки являются высококалорийными продуктами, которые могут влиять на метаболические функции, роль потребления алкоголя в увеличении веса тела проанализирована в США в ходе национального эпидемиологического обследования по алкоголю и сопутствующим условиям (NESARC). Установлено, что увеличение частоты и интенсивности приема алкоголя связано со статистически достоверным, но количественно небольшим увеличением веса тела у мужчин, но не у женщин [33].

На животных разработана специальная модель для изучения метаболических и нейрональных последствий чрезмерного потребления жиров и алкоголя. Результаты дают убедительное подтверждение существования петель положительной обратной связи, которые включают тесную взаимосвязь между циркулирующими липидами и орексигенными пептидами в дорсальном регионе гипоталамуса. Пептиды, вовлеченные в эти циклы, включают галанин, энкефалин, динорфин и орексин [34]. Эти пептиды экспрессируются в паравентрикулярных ядрах и латеральном гипоталамусе и имеют функции, отличные от пептидов, экспрессируемых в аркообразных ядрах. Все эти пептиды в дорсальном гипоталамусе увеличиваются при потреблении жиров и этанола через механизмы, вовлекающие возросшие на высокоэнергетичной диете уровни циркулирующих липидов. Эти нутриенты, в свою очередь, стимулируют дальнейшую продукцию тех же пептидов, которые способствуют объеданию и злоупотреблению алкоголем. Данные механизмы, вовлекающие негомеостатические циклы с положительной обратной связью, могут быть необходимы в условиях, когда запасы продовольствия недостаточны и периоды объедания нужны для выживания. Однако они имеют патологические и иногда опасные для жизни последствия в современном обществе, где богатая жирами пища и алкогольные напитки доступны в изобилии и вносят вклад в существенный рост ожирения и диабета [34].

Алкоголь и риск сахарного диабета. Имеются многочисленные эпидемиологические данные, которые показывают, что потребление алкоголя может влиять на риск развития сахарного диабета двухфазным образом. Легкое и умеренное потребление алкоголя снижает риск развития сахарного диабета второго типа у мужчин и женщин, а его злоупотребление является вредным [35–38]. Предположение о том, что алкоголь улучшает чувствительность к инсулину, проверялось в единичных контролируемых исследованиях. На лицах с потреблением алкоголя от умеренного до высокого (40–110 г/день) было изучено, влияет ли снижение употребления алкоголя на чувствительность к инсулину [39]. Существенное снижение приема алкоголя от 7,2 до 0,8 стандартных порций ($72,4 \pm 5,0$ г/день против $7,9 \pm 1,6$ г/день, $p < 0,001$) у здоровых мужчин не изменило чувствительность к инсулину, измеренную по его уровню в тесте с введением низкой дозы глюкозы и уровню, измеренному натощак, уровню глюкозы и баллам в гомеостатической модели оценки (НОМА) [39].

Поскольку повышенная чувствительность к инсулину может вносить вклад в описанную ассоциацию между умеренным потреблением алкоголя и сниженным риском болезней сердца и диабета, оценена способность умеренного употребления алкоголя улучшать чувствительность к инсулину. У 20 лиц с резистентностью к инсулину в течение 8 недель изучалось влияние приема 30 г алкоголя (водки – у 9 человек, красного вина – у 11) на резистентность к инсулину, концентрации глюкозы, инсулина, липопротеинов. Резистентность к инсулину в целом по группе снизилась на 8 % ($p = 0,08$), а холестерол ЛПВП увеличился ($p = 0,02$). Тенденции были одинаковыми у лиц, принимавших водку или красное вино. Результаты показывают, что 8-недельное умеренное потребление алкоголя оказывает минимальное влияние на увеличение чувствительности к инсулину у недиабетиков. Возникает вопрос, играет ли вообще какую-нибудь роль улучшение чувствительности к инсулину у пациентов умеренное потребление алкоголя [40].

Хотя алкоголь оказывает различные эффекты на метаболизм глюкозы, клиническая проблема употребления алкоголя у пациентов с сахарным диабетом заключается в увеличенном риске нарушений диеты в результате хронического потребления алкоголя. Показано, что регулярный прием алкоголя на уровне 0,5–1 г/день на 1 кг массы тела, что эквивалентно 30–60 г/день для человека весом 60 кг, негативно влияет на контроль глюкозы в крови. Кроме того, большее внимание необходимо уделять пациентам с диабетом, которые принимают гипогликемические препараты, потому что хроническое употребление алкоголя индуцирует метаболизирующий лекарства фермент цитохром *CYP2E1* в микросомах печени и ускоряет скорость метаболизма препаратов сульфонилмочевины, сокращая период действия лекарства. Кроме того, когда пациенты с диабетом принимают гипогликемические лекарства в состоянии алкогольной интоксикации без адекватного питания, конкурентный метаболизм алкоголя и лекарства могут продлить его фармакологический эффект, приводя к эпизоду гипогликемии [41].

Остается неизученным вопрос, улучшает ли употребление алкоголя чувствительность к инсулину во всех фенотипах по весу тела, модифицирует ли действие алкоголя на чувствительность к инсулину вес тела или содержание жира в организме. В связи с этим изучены изменения экспрессии генов в эпидидимальной белой жировой ткани мышей, получающих диету с ограниченной калорийностью, низким содержанием жиров или высоким содержанием жиров и в дополнение к этому в качестве питья воду или 20 %-ный этанол. У мышей ожирение вызвало резистентность к инсулину, а ограниченная калорийность и алкоголь улучшили чувствительность к нему. Резистентность к инсулину у мышей с ожирением сочеталась с увеличенной экспрессией маркеров воспаления *Cd68* и *Il-6*. Авторы полагают, что алкоголь восстанавливает чувствительность к инсулину посредством ап-регуляции противовоспалительных генов [42].

Тип употребления алкоголя, когда человек доводит себя до состояния опьянения (binge drinking), принимая 5 порций алкоголя в течение 2 ч у мужчин и 4 порций алкоголя у женщин хотя бы 1 раз в месяц, чаще ассоциируется с увеличенным риском развития МС и диабета второго типа. Нарушает ли такой тип пьянства гомеостаз глюкозы и действие инсулина, не известно. Для проверки этого крысы Спрэг-Дули ежедневно получали алкоголь в дозе 3 г/кг в течение 3 дней, чтобы симулировать пьянство у людей. Установлено, что у этих крыс развивается и сохраняется резистентность к инсулину даже после того, как концентрация алкоголя в крови не определяется. Животные сохраняли резистентность к инсулину до 54 ч после последней дозы алкоголя в результате нарушения действия инсулина в печени и жировой ткани. У крыс, получавших алкоголь, нарушалось действие инсулина в гипоталамусе, определенное как способность инсулина, введенного в медиобазальный гипоталамус, угнетать продукцию глюкозы в печени и липолиз в белой жировой ткани. Сигналирование инсулина в гипоталамусе, определенное по фосфорилированию рецепторов инсулина, было снижено после приема алкоголя. Количественная полимеразная цепная реакция показала усиление воспаления в гипоталамусе и экспрессию белка тирозин фосфатазы *1B (PTP1B)* – негативного регулятора сигналирования инсулина. Интрацеребровентрикулярная инфузия низкомолекулярного ингибитора *PTP1B* предупреждала индуцированную токсической дозой алкоголя интолерантность к глюкозе. Эти результаты показывают, что этанол в дозах, вызывающих интоксикацию у крыс, индуцирует системную

резистентность к инсулину, нарушая действие инсулина в гипоталамусе и что этот эффект может быть предупрежден ингибированием тирозин фосфатазы 1В в мозге [43].

Излишний вес и болезни печени. Накопление висцерального жира, ожирение и сахарный диабет лежат в основе патологических факторов МС. В печени МС может сопровождаться стеатозом или стеатогепатитом. На прогрессирование алкогольной болезни печени оказывают эффект следующие факторы: половые отличия, наличие вирусного гепатита, иммунологические нарушения, генетический полиморфизм ферментов метаболизма алкоголя, а также ожирение и избыточный вес. К независимым факторам риска алкогольной болезни печени в настоящее время относится избыточная масса тела. Вероятная причина – значительное накопление жира в гепатоцитах у тучных людей, усиливающее оксидативный стресс. В связи с тем что алкоголь ингибирует окисление жирных кислот в митохондриях печени и способствует синтезу триглицеридов из жирных кислот, прием во время еды жиров и алкоголя усилит тяжесть жирового поражения печени пропорционально потреблению жиров [44]. Изучение биопсий печени от 152 алкоголиков позволило утверждать, что длительность периода злоупотребления алкоголем, возраст и вес тела являются важными факторами, которые коррелируют с гистологическими стадиями болезни [45]. Алкогольная болезнь печени прогрессирует с возрастанием процента лишнего веса, и ожирение является существенным фактором в прогрессировании алкогольной болезни печени.

Обследование 13 580 взрослых лиц показало, что прием 1–2 порций алкоголя в день (12–24 г) приводит к более высокой частоте обнаружения уровней аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови выше нормальных величин у людей с избыточным весом, чем у лиц с нормальным весом [46]. В случаях алкогольной болезни печени, сопровождающейся ожирением, избыточное питание глубоко вовлечено в прогрессирование патологических проявлений болезни (гепатоза, гепатита, фиброза и цирроза печени).

Закключение. Данные мета-анализа проспективных исследований свидетельствуют, что злоупотребление алкоголем ассоциировано с увеличенным риском развития МС, тогда как очень низкое потребление (меньше 20 г/день у женщин и 40 г/день у мужчин) – со сниженным риском МС. Потребление алкоголя в диапазоне от низкого до умеренного снижает риск развития артериальной гипертензии у женщин и увеличивает риск заболевания у мужчин. Эпидемиологические исследования показали, что увеличение частоты и интенсивности приема алкоголя связано со статистически достоверным, но количественно небольшим увеличением веса тела у мужчин, но не у женщин. Имеются доказательства того, что потребление алкоголя может влиять на риск развития сахарного диабета двухфазным образом. Легкое и умеренное потребление алкоголя снижает риск диабета второго типа у мужчин и женщин, а злоупотребление является опасным.

Результаты ряда исследований доказали пользу от регулярного низкого и умеренного приема алкоголя для лиц с МС в виде антисклеротического эффекта, повышения уровня холестерина ЛПВП, снижения концентраций триглицеридов и общего холестерина, апополипротеина В, ЛПНП, а также снижения артериального давления. Однако с учетом нелинейности эффектов потребления алкоголя даже в границах от низкого до умеренного увеличенное потребление не всегда приводило к большей пользе для здоровья [24–26]. Исходя из этого, исследователи полагают, что указанные выше уровни алкоголя ни в коем случае не должны рекомендоваться пациентам с МС, которые алкоголь не употребляют [31].

Требуют внимания пациенты с МС, которые имеют высокое потребление алкоголя, потому что прием алкоголя способствует прогрессированию поражения печени. Поскольку алкоголь влияет на энергетический метаболизм, обмен липидов и углеводов, является источником энергии, рекомендации по снижению потребления алкоголя являются важным аспектом в лечении МС [41]. Необходимо информировать пациентов с избыточным весом и ожирением о калорийности спиртных напитков.

Список использованной литературы

1. Избыточная масса тела и ожирение: эффективность модификации образа жизни и контроля поступающих с пищей жиров / Л. И. Данилова [и др.] // Здравоохранение. – 2014. – № 12. – С. 50–53.

2. Global strategy to reduce the harmful use of alcohol. – Geneva: WHO, 2010. – 38 p.
3. Alcohol consumption, alcohol dependence and attributable burden of disease in Europe: potential gains from effective interventions for alcohol dependence / J. Rehm [et al.] // Center for Addiction and Mental Health. – 2012. – 144 p.
4. Global status report on alcohol and health 2014 / World Health Organization, 2014.
5. World Health Organization. Global status report on alcohol and health. – Geneva, Switzerland: WHO Press, 2011. – 286 p.
6. World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioral disorders: diagnostic criteria for research. – Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1993.
7. Baik, I. Prospective study of alcohol consumption and metabolic syndrome / I. Baik, Ch. Shin // Am. J. Clin. Nutr. – 2008. – Vol. 87. – P. 1455–1463.
8. Alcohol consumption and the prevalence of metabolic syndrome: a meta-analysis of observational studies / A. Alkerwi [et al.] // Atherosclerosis. – 2009. – Vol. 204, N 2. – P. 624–635.
9. Alcohol consumption and risk of metabolic syndrome: a meta-analysis of prospective studies / K. Sun [et al.] // Clin. Nutrition. – 2013. – Vol. 33, N 4. – P. 596–602.
10. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis / P. E. Ronksley [et al.] // B. M. J. – 2011. – Vol. 342. – doi: 10.1136/bmj.d671.
11. Association of genetic polymorphisms in ADH and ALDH2 with risk of coronary artery disease and myocardial infarction: a meta-analysis / H. Han [et al.] // Gene. – 2013. – Vol. 526 (2). – P. 134–141.
12. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies / S. E. Brien [et al.] // B. M. J. – 2011. – Vol. 342. – doi: 10.1136/bmj.d636.
13. Influence of pattern of drinking on cardiovascular disease and cardiovascular risk factors: a review / I. B. Puddey [et al.] // Addiction. – 1999. – Vol. 94. – P. 649–663.
14. Rehm, J. Average volume of alcohol consumption, patterns of drinking and risk of coronary heart disease: a review / J. Rehm, C. Sempos, M. Trevisan // J. Cardiovasc. Risk. – 2003. – Vol. 10. – P. 15–20.
15. Roerecke, M. Ischemic heart disease mortality and morbidity rates in former drinkers: a meta-analysis / M. Roerecke, J. Rehm // Am. J. Epidemiol. – 2011. – Vol. 173, N 3. – P. 245–258.
16. Alcohol consumption and the risk of hypertension in women and men / H. D. Sesso [et al.] // Hypertension. – 2008. – Vol. 51. – P. 1080–1087.
17. High-density lipoprotein subclasses are a potential intermediary between alcohol intake and reduced risk of cardiovascular disease: the Rancho Bernardo Study / N. D. Muth // Br. J. Nutr. – 2010. – Vol. 104, N 7. – P. 1034–1042.
18. Wakabayashi, I. Relationship between alcohol intake and lipid accumulation product in middle-aged men / I. Wakabayashi // Alcohol Alcohol. – 2013. – Vol. 48, N 5. – P. 535–542.
19. Klop, B. Alcohol and plasma triglycerides / B. Klop, A. T. do Rego, M. C. Cabezas // Curr. Opin. Lipidol. – 2013. – Vol. 24, N 4. – P. 321–326.
20. Metabolic and biochemical effects of low-to-moderate alcohol consumption / J. B. Whitfield [et al.] // Alcohol Clin. Exp. Res. – 2013. – Vol. 37, N 4. – P. 575–586.
21. Brinton, E. A. Effects of ethanol intake on lipoproteins / E. A. Brinton // Curr. atherosclerosis reports. – 2012. – Vol. 14, N 2. – P. 108–114.
22. Effects of moderate red wine consumption on liver fat and blood lipids: a prospective randomized study / S. Kechagias [et al.] // Ann. Med. – 2011. – Vol. 43, N 7. – P. 545–554.
23. A moderate red wine intake improves blood lipid parameters and erythrocytes membrane fluidity in post myocardial infarct patients / J. P. Rifler [et al.] // Mol. Nutr. Food Res. – 2012. – Vol. 56, N 2. – P. 345–351.
24. Sozio, M. S. What advice should be given to patients with NAFLD about the consumption of alcohol? / M. S. Sozio, N. Chalasani, S. Liangpunsakul // Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol. – 2009. – Vol. 6. – P. 18–19.
25. Moderate wine consumption in the prevention of metabolic syndrome and its related medical complications / L. Liu [et al.] // Endocrinol. Metab. Immune. Disord. Drug Targets. – 2008. – Vol. 8. – P. 89–98.
26. Causal Role of Alcohol Consumption in an Improved Lipid Profile: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study / N. Vu. Khanh [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 2.: e0148765. Publ. online 2016 Feb 5. doi: 10.1371/journal.pone.0148765.
27. Exploring causal associations between alcohol and coronary heart disease risk factors: findings from a Mendelian randomization study in the Copenhagen General Population Study / D. A. Lawlor [et al.] // Eur. Heart. J. – 2013. – Vol. 34, N 32. – P. 2519–2528.
28. Cederbaum, A. I. Alcohol metabolism / A. I. Cederbaum // Clin. Liver Dis. – 2012. – Vol. 16, N 4. – P. 667–685.
29. Lands, W. E. M. A review of alcohol clearance in humans / W. E. M. Lands // Alcohol. – 1998. – Vol. 15, N 2. – P. 147–160.
30. Lieber, C. S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism / C. S. Lieber // Clin. Chim. Acta. – 1997. – Vol. 257, N 1. – P. 59–84.
31. Ishii, H. The significance and means to limit alcohol consumption / H. Ishii // J. Jap. Med. Assoc. – 2007. – Vol. 136 (Special Issue 1). – P. S213–S216.
32. Sim, F. Alcoholic drinks contribute to obesity and should come with mandatory calorie counts / F. Sim // BMJ. – 2015. – Vol. 350:h2047.
33. Alcohol consumption and body weight / M. T. French [et al.] // Health Econ. – 2010. – Vol. 19, N 7. – P. 814–832.

34. *Leibowitz, S. F.* Overconsumption of dietary fat and alcohol: Mechanisms involving lipids and hypothalamic peptides / S. F. Leibowitz // *Physiol. Behav.* – 2007. – Vol. 91, N 5. – P. 513–521.
35. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women / F. B. Hu [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 345, N 11. – P. 790–797.
36. Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis of prospective observational studies / L. L. Koppes [et al.] // *Diabetes Care.* – 2005. – Vol. 28, N 3. – P. 719–725.
37. Effects of moderate alcohol intake on fasting insulin and glucose concentrations and insulin sensitivity in postmenopausal women: a randomized controlled trial / M. J. Davies [et al.] // *JAMA.* – 2002. – Vol. 287, N 19. – P. 2559–2562.
38. Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis / D. Baliunas [et al.] // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32. – P. 2123–2132.
39. The effect of alcohol intake on insulin sensitivity in men / R. R. Zilkens [et al.] // *Diabetes Care.* – 2003. – Vol. 26. – P. 608–612.
40. Effect of moderate alcoholic beverage consumption on insulin sensitivity in insulin resistant, nondiabetic individuals / S. H. Kim [et al.] // *Metabolism.* – 2009. – Vol. 58, N 3. – P. 387–392.
41. Alcoholic liver disease and its relationship with metabolic syndrome / H. Ishii [et al.] // *JMAJ.* – 2010. – Vol. 53, N 4. – P. 236–242.
42. Effects of body weight and alcohol consumption on insulin sensitivity / Q. X. Paulson [et al.] // *Nutrition J.* – 2010. – Vol. 10. – P. 9–14.
43. Binge drinking induces whole-body insulin resistance by impairing hypothalamic insulin action / C. Lindtner [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2013. – Vol. 170: 170ra14.
44. *Lieber, C. S.* Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis / C. S. Lieber // *Alcohol.* – 2004. – Vol. 34. – P. 9–19.
45. Overweight as a risk factor or a predictive sign of histological liver damage in alcoholics / H. Iturriaga [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1988. – Vol. 47. – P. 235–238.
46. *Ruhl, C. E.* Joint effects of body weight and alcohol on elevated serum alanine aminotransferase in the United States population / C. E. Ruhl, J. E. Everhart // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – Vol. 3. – P. 1260–1268.

Поступила в редакцию 21.06.2016

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Редакция журнала «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук» просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Если рукопись им не соответствует, статья не будет принята к рассмотрению.

I. Статьи о результатах работ, проведенных в научных учреждениях, должны иметь разрешение на опубликование (сопроводительное письмо ректората или дирекции соответствующего института либо выписку из протокола заседания ученого совета, отдела или кафедры, а также акт экспертизы).

II. Статья предоставляется в редакцию в двух экземплярах на белорусском, русском или английском языках; шрифт – Times New Roman, кегль – 11 (в том числе в формулах); межстрочный интервал – 1,5. Занумерованные формулы выключаются в отдельную строку. В тексте не допускаются рукописные вставки и вклейки. Статья должна быть подписана всеми авторами.

III. Статья должна иметь следующую структуру:

1. Индекс по Универсальной десятичной классификации (УДК);
инициалы и фамилии авторов;
название статьи;
полное наименование учреждений, где работают авторы, с указанием города и страны, адрес электронной почты каждого автора.

2. Аннотация (авторское резюме) объемом 150–250 слов должна кратко представлять результаты работы и быть понятной, в том числе и в отрыве от основного текста статьи; должна быть информативной, хорошо структурированной (один из вариантов написания аннотации – краткое повторение структуры статьи, включающее введение, цели и задачи, методы, результаты, заключение или выводы).

3. Ключевые слова – набор слов, отражающих содержание текста в терминах объекта, научной отрасли и методов исследования; рекомендуемое количество ключевых слов 5–10.

4. Затем метатекстовые данные (все то, что предшествует основному тексту статьи) приводятся *на английском языке*, причем аннотация должна быть оригинальной (т. е. не являться дословным переводом русскоязычной аннотации). Если статья англоязычная – вышеуказанные данные приводятся на русском (белорусском) языке.

5. Основной текст статьи не должен превышать 16 с. (т. е. около 40 тыс. знаков); в этот объем также входят таблицы и рисунки (до 10). Изложенный материал должен быть четко структурированным: введение, цели и задачи, методы, результаты, заключение (выводы). В русско- и белорусскоязычных статьях рекомендуется делать подрисуночные подписи и надписи на самих иллюстрациях на двух языках – *русском (белорусском) и английском*.

6. Список использованной литературы (не более 40 ссылок) оформляется в соответствии с требованиями Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь (ГОСТ 7.1-2003). Цитируемая литература приводится общим списком по мере упоминания, ссылки в тексте даются порядковым номером в квадратных скобках (напр., [1]); ссылки на неопубликованные работы не допускаются).

7. Затем приводится список цитированных источников *в романском алфавите* (латиница) («References») со следующей структурой: авторы (транслитерация), название статьи в транслитерированном варианте [перевод названия статьи на английский язык в квадратных скобках], название русскоязычного источника (транслитерация) [перевод названия источника на англий-

ский язык – парафраз (для журналов можно не делать)], выходные данные с обозначениями на английском языке.

Примеры подготовлены по материалам методических рекомендаций «Редакционная подготовка научных журналов для включения в зарубежные индексы цитирования» О. В. Кирилловой (http://elsevierscience.ru/files/kirillova_editorial.pdf).

Статьи из журналов:

Zagurenko A.G., Korotovskikh V.A., Kolesnikov A.A., Timonov A.V., Kardymon D.V. Tekhniko-ekonomicheskaya optimizatsiya dizaina gidrorazryva plasta [*Techno-economic optimization of the design of hydraulic fracturing*]. Neftyanoe khozyaistvo = Oil Industry, 2008, no.11, pp. 54-57.

Описание статьи из электронного источника:

Swaminathan V., Lepkoswka-White E., Rao B.P. *Browsers or buyers in cyberspace? An investigation of electronic factors influencing electronic exchange*. Journal of Computer-Mediated Communication, 1999, vol. 5, no. 2. Available at: <http://www.ascusc.org/jcmc/vol5/issue2/> (Accessed 28 April 2011).

Описание статьи с DOI:

Zhang Z., Zhu D. *Experimental research on the localized electrochemical micromachining*. Russian Journal of Electrochemistry, 2008, vol. 44, no. 8, pp. 926-930. doi: 10.1134/S1023193508080077.

Описание статьи из продолжающегося издания (сборника трудов):

Astakhov M. V., Tagantsev T. V. Eksperimental'noe issledovanie prochnosti soedinenii «stal'-kompozit» [*Experimental study of the strength of joints "steel-composite"*]. Trudy MGТУ «Matematicheskoe modelirovanie slozhnykh tekhnicheskikh sistem» [*Proc. of the Bauman MSTU "Mathematical Modeling of Complex Technical Systems"*], 2006, no. 593, pp. 125-130.

Описание материалов конференций:

Usmanov T. S., Gusmanov A. A., Mullagalin I. Z., Muhametshina R. Ju., Chervyakova A. N., Sve-shnikov A. V. Osobennosti proektirovaniya razrabotki mestorozhdeniy s primeneniem gidrorazryva plasta [*Features of the design of field development with the use of hydraulic fracturing*]. Trudy 6 Mezhdunarodnogo Simpoziuma "Novye resursosbergayushchie tekhnologii nedropol'zovaniya i povysheniya neftegazootdachi" [*Proc. 6th Int. Symp. "New energy saving subsoil technologies and the increasing of the oil and gas impact"*]. Moscow, 2007, pp. 267-272.

Описание книги (монографии, сборники):

Izvekov V. I., Serikhin N. A., Abramov A. I. Proektirovanie turbogeneratorov [*Design of turbo-generators*]. Moscow, MEI Publ., 2005, 440 p.

Описание Интернет-ресурса:

APA Style (2011). Available at: <http://www.apastyle.org/apa-style-help.aspx> (accessed 5 February 2011).

Pravila Tsitirovaniya Istochnikov (*Rules for the Citing of Sources*) Available at: <http://www.scribd.com/doc/1034528/> (accessed 7 February 2011)

Описание диссертации или автореферата диссертации:

Semenov V. I. Matematicheskoe modelirovanie plazmy v sisteme kompaktnyi tor. Diss. dokt. fiz.-mat. nauk [*Mathematical modeling of the plasma in the compact torus. Dr. phys. and math. sci. diss.*]. Moscow, 2003. 272 p.

Описание ГОСТа:

GOST 8.586.5–2005. Metodika vypolneniia izmerenii. Izmerenie raskhoda i kolichestva zhidkosti i gazov s pomoshch'iu standartnykh suzhaiushchikh ustroystv [*State Standard 8.586.5 – 2005. Method of measurement. Measurement of flow rate and volume of liquids and gases by means of orifice devices*]. Moscow, Standartinform Publ., 2007. 10 p.

Описание патента:

Palkin M. V., e.a. Sposob orientirovaniia po krenu letatel'nogo apparata s opticheskoi golovkoi samonavedeniia [*The way to orient on the roll of aircraft with optical homing head*]. Patent RF, no. 2280590, 2006.

8. Если присутствует информация о финансировании (поддержке грантами проектов и т. п.), ее следует давать на русском и английском языках под заголовками «Благодарности» («Acknowledgements»).

IV. Для подготовки метаданных (так называемый информационный лист) на отдельной странице следует указать *на русском и английском языках* для каждого автора: фамилию, имя и отчество (полностью), звание, должность, место работы с указанием адреса, контактную информацию (e-mail, телефоны).

V. Электронный вариант статьи предоставляется на диске, флэшке или присылается по электронной почте в редакцию журнала – medvesti@mail.ru. Текст должен быть набран в Word под Windows, формулы – в редакторе MathType. Собственным редактором формул версий Microsoft Office 2007 и выше пользоваться нельзя, так как в редакционно-издательском процессе он не поддерживается. Вставку символов выполнять через меню «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2 , C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс», «Формат\Шрифт\Нижний индекс». Латинские буквы необходимо набирать *курсивом*, греческие – прямо (для набора греческих символов следует пользоваться гарнитурой Symbol). Обозначения математических функций (lim, sup, ln, sin, Re, Im и т. п.), символы химических элементов (N, Cl) также набираются прямым шрифтом.

VI. Черно-белые и цветные рисунки вставляются в текст статьи (Word), а также даются в виде отдельных файлов в формате tif (600 точек на дюйм). Желательно также предоставлять их в формате оригинала (Corel, диаграммы в Excel, Origin Pro и т. д.), т. е. в той программе, в которой они выполнены. Текст на рисунках набирается основной гарнитурой, причем начертание символов (греческое, латинское) должно соответствовать их начертанию в тексте. Размер кегля соизмерим с размером рисунка (желательно 8 пунктов). На обороте рисунков (если они даются отдельно) указываются фамилии авторов, название статьи. Фотографии предоставляются в виде файлов (tif, jpg, png, eps) и в распечатанном виде.

VII. Поступившая в редакцию статья направляется на рецензию, затем визируется членом редколлегии. Основным критерием целесообразности публикации является новизна и информативность статьи. Если по рекомендации рецензента статья возвращается автору на доработку, то переработанная рукопись вновь рассматривается редколлекцией. Статьи не по профилю журнала возвращаются авторам после заключения редколлегии.

Материалы для публикации следует направлять по адресу: *ул. Академическая, 1, к. 119, редакция журнала «Весці НАН Беларусі. Серыя медыцынскіх навук», 220072, г. Минск, Республика Беларусь* либо по электронной почте: *medvesti@mail.ru*. Тел. для справок: +375 17 284 19 19 (понедельник, среда, четверг).