ISSN 1814-6023 (print)

ВЕСЦІ
НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2017. № 1

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2017. № 1

Журнал основан в 2004 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 393 от 18 мая 2009 г.

Входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований, включен в базу данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)

Редакционная коллегия

А. В. Сукало, Президиум Национальной академии наук Беларуси (*главный редактор*),
И. В. Залуцкий, Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси (*заместитель главного редактора*),
Н. С. Сердюченко, Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси (*заместитель главного редактора*),
В. Г. Колосовская (*ведущий редактор журнала*),
О. В. Алейникова, Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии,
Ф. И. Висмонт, Белорусский государственный медицинский университет,
М. А. Герасименко, Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Ю. Е. Демидчик, Белорусская медицинская академия последипломного образования,
С. Л. Кабак, Белорусский государственный медицинский университет,
Н. П. Митьковская, Белорусский государственный медицинский университет,
А. Г. Мрочек, Республиканский научно-практический центр «Кардиология»,
Д. Л. Пиневич, Первый заместитель Министра здравоохранения Республики Беларусь,
О. О. Руммо, 9-я городская клиническая больница г. Минска,
А. Ф. Смеянович, Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии,

А. Н. Стожаров, Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси,
Л. П. Титов, Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
В. С. Улащик, Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси

Редакционный совет

Э. Алекнавичус, Национальный институт рака (Литовская Республика),
Марк М. Ван Гулле, Университет Лёвен (Бельгия),
Д. Джурич, Институт медицинской физиологии Ричарда Бьюриана Университета Белграда (Республика Сербия),
Т. П. Клюшник, Научный центр психического здоровья Российской академии медицинских наук (Российская Федерация),
В. А. Кульчицкий, Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси,
М.-А. Кусто, Анжерский университет (Французская Республика),
А. И. Мартынов, Медицинский центр Управления делами Президента Российской Федерации (Российская Федерация),
Л. И. Надольник, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси,
Р. Г. Оганов, Российское кардиологическое общество (Российская Федерация),
Н. Д. Савенкова, Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия (Российская Федерация),
М. В. Угрюмов, Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова Российской академии наук (Российская Федерация),
И. А. Чешик, Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси

Адрес редакции:
ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 284-19-19; e-mail: medvesti@mail.ru
vestimed.belnauka.by

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.
Серия медицинских наук. 2017. № 1.
Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *Н. И. Кашуба*

Подписано в печать 16.02.2017. Выход в свет 24.02.2017. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 54 экз. Заказ 23.
Цена номера: индивидуальная подписка – 10,34 руб., ведомственная подписка – 25,29 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука».
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук, 2017

ISSN 1814-6023 (print)

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICAL SERIES. 2017. no. 1

The Journal was founded in 2004

Published quarterly

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus in the State Registry of Mass Media, reg. no. 393

The Journal is included in the List of Journals for Publication of the Results of Dissertation Research in the Republic of Belarus and in the Database of Russian Science Citation Index (RSCI)

Editorial Board

A. V. Sukalo, Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus (*Editor-in-Chief*),
I. V. Zalutsky, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (*Associate Editor-in-Chief*),
N. S. Serdyuchenko, Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus (*Associate Editor-in-Chief*),
V. G. Kolosovskaya (*Managing Editor*),
O. V. Aleinikova, Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Yu. E. Demidchik, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education,
M. A. Gerasimenko, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education,
S. L. Kabak, Belarusian State Medical University,
N. P. Mitkovskaya, Belarusian State Medical University,
A. G. Mrochek, Republican Scientific and Practical Centre of Cardiology,
D. L. Pinevich, First Deputy Minister of Health of the Republic of Belarus,
O. O. Rummo, 9th City Clinical Hospital, Minsk,
A. F. Smeyanovich, Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery,
A. N. Stozharov, **Institute for Nature Management** of the National Academy of Sciences of Belarus,
L. P. Titov, Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology,
V. S. Ulashchik, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,
F. I. Vismont, Belarusian State Medical University

Editorial Council

E. Aleknavicius, National Cancer Institute (Lithuania),
I. A. Cheshik, Institute of Radiobiologyof the National Academy of Sciences of Belarus (Republic of Belarus)
M.-A. Custaud,University of Angers (French Republic),
D. Djuric, Institute of Medical Physiology "Richard Burian", University of Belgrade (Republic of Serbia),
Mark M. Van Hulle, University of Leuven (Belgium),
T. P. Klyushnik, Mental Health Research Center of the Russian Academy of Sciences (RussianFederation),
V. A. Kulchitsky, Institute of Physiologyof the National Academy of Sciences of Belarus (RepublicofBelarus),
A. I. Martynov, Main Medical Department, Office of the President of the Russian Federation (Russian Federation),

L. I. Nadolnik, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compoundsof the National Academy of Sciences of Belarus (Republic of Belarus),
R. G. Oganov, Russian Society of Cardiology (Russian Federation),
N. D. Savenkova, Saint-PetersburgStatePediatricMedicalAcademy (RussianFederation),
M. V. Ugryumov, Instituteof Development Biologynamed after N. K. Koltsov (Russian Federation)

Address of the Editorial Office:
Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Tel.: +375 17 284-19-19; e-mail: medvesti@mail.ru
vestimed.belnauka.by

PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.
Medical series, 2017, no. 1.
Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *N. I. Kashuba*

Sent for press 16.02.2017. Output 24.02.2017. Format 60×84$^{1}/_{8}$. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 54 copies. Order 23.
Number price: individual subscription – 10,34 byn., departmental subscription – 25,29 byn.

Publisher and printing execution:
Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka".
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer,
distributor of printing editions no. 1/18 dated of August 2, 2013. License for press no. 02330/455 dated of December 30, 2013.
Address: F. Skorina Str., 40, 220141, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series, 2017

ISSN 1814-6023 (print)

ЗМЕСТ

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Коритко А. А., Кривенко С. И., Щерба А. Е., Примакова Е. А., Гомон А. А., Петровская Е. Г., Дедюля Н. И., Бузук Е. С. Роль мезенхимальных стволовых клеток в поддержании жизнеспособности и функциональной активности культуры гепатоцитов *in vitro* 7

Висмонт Ф. И., Лобанова В. В. Роль клеток Купфера и L-аргинин-NO системы в процессах детоксикации и развитии оксидативного стресса у крыс при хронической алкоголизации 15

Татчихин В. В., Залуцкий И. В., Аничкин В. В. Хирургическое лечение пациентов с плоскоклеточным раком орофарингеальной области..... 21

Кирко С. Н., Гуринович В. А., Лукиенко Е. П., Мойсеёнок А. Г., Буко В. У. Сравнительная оценка жирнокислотного состава печени крыс при включении в рацион рапсового и пальмового масел 29

Киселёв Л. П., Алейникова О. В. Примитивная нейроэктодермальная опухоль костей и мягких тканей у пациентов детского возраста Республики Беларусь: клинические исходы и показатели выживаемости за 15-летний период..... 38

Чешик И. А., Никитин А. Н., Сухарева Д. В., Медведева Е. А., Гапоненко С. О. Влияние микробиологических препаратов ЕМ-1 и EMX-Gold на биокинетику ^{137}Cs в организме лабораторных животных 46

Гайшун Е. И., Гайшун И. В. Потери давления во внутренней сонной артерии в точке бифуркации в норме и при нарушениях гемодинамики 54

Деревянко И. А., Новаковская С. А., Кузнецова И. В. Гистологические и ультраструктурные изменения миокарда в динамике экспериментального сахарного диабета 60

Ревтович М. Ю., Шмак А. И., Красько О. В., Смолякова Р. М., Бабенко А. С. Прогностическое значение метилирования гена *Reprimo* у пациентов с резектабельным раком желудка..... 66

Деревянко М. А., Рябцева С. Н., Залуцкий И. В. Клинико-морфологическая и морфометрическая характеристика колоректального рака с разными формами распространения 78

Арчакова Л. И., Новаковская С. А. Клеточные механизмы антрациклиновой кардиомиопатии при действии антибиотика доксорубицина..... 83

Мацюк Я. Р., Парамонова Н. С., Карчевский А. А., Барабан О. В. Морфо-гистохимическая характеристика экзокриноцитов слизистой оболочки желудка у детей с хроническим гастритом на фоне дисплазии соединительной ткани 90

Жукова Т. В., Смеянович А. Ф., Безубик С. Д., Кузнецов Я. О. Механизмы роста трансформированных нейроэпителиальных опухолей..... 97

Миронова Г. П., Пашкевич С. Г. Влияние интраназальной аппликации гамма-аминомасляной кислоты на процессы запоминания у крыс в условиях гипоксии 103

Пашкевич С. Г., Токальчик Д. П., Миронова Г. П., Досина М. О., Тихонович О. Г., Стукач Ю. П., Калюнов В. Н. Реализация жизненно важных функций крыс в условиях реорганизации нейронных сетей гиппокампа мезенхимальными стволовыми клетками..... 111

Шевела Т. Л., Походенько-Чудакова И. О. Эффективность иммунохроматографического определения антител к *Helicobacter pylori* в ротовой жидкости пациентов с периимплантитом..... 118

Бонь Е. И., Зиматкин С. М. Особенности органеллогенеза в нейронах коры мозга крыс после пренатальной алкоголизации 123

ISSN 1814-6023 (print)

CONTENTS

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

Karytka A. A., Krivenko S. I., Shcherba A. E., Prymakova Y. A., Homan A. A., Pyatrouskaya K. G., Dzyadzyulya N. I., Buzuk E. S. Role of mesenchymal stem cells in maintaining the viability and functional activity of hepatocyte culture *in vitro* 7

Vismont F. I., Lobanova V. V. Role of the Kupffer cells and the L-arginine-NO system in detoxication processes and oxidative stress in the rat's liver within chronic alcoholization 15

Tatchikhin V. V., Zalutskii I. V., Anichkin V. V. Surgical treatment of patients with squamous cell carcinoma of the oropharyngeal area 21

Kirko S. N., Gurinovich V. A., Lukienko E. P., Moiseenok A. G., Buko V. U. Comparison of the liver fatty acids content in rats fed canola and palm oil reach diet 29

Kisialeu L., Aleinikova O. Clinical outcomes and survival rates over the 15-year period in pediatric patients with peripheral primitive neuroectodermal tumor of bone and soft tissues in Republic of Belarus 38

Cheshyk I. A., Nikitin A. N., Sukhareva D. V., Medvedeva E. A., Gaponenka S. O. Impact of microbiological preparations EM-1 and EMX-Gold on biokinetics of ^{137}Cs in the laboratory animals 46

Gaishun E. I., Gaishun I. V. Pressure losses in the internal carotid artery at the bifurcation point at normal hemodynamics and at its disturbances 54

Derevyanko I. A., Novakovskaya S. A., Kuznetsova I. V. Histological and ultrastructural state of the myocardium in the dynamics of experimental diabetes 60

Reutovich M. Yu., Shmak A. I., Krasko O. V., Smolyakova R. M., Babenko A. S. Prognostic value of *Reprimo* methylation in patients with resectable gastric cancer 66

Derevyanko M. A., Rjabceva S. N., Zalutskii I. V. Clinical and morphological and morphometric characteristics of colorectal cancer with different forms of spread 78

Archakova L. I., Novakovskaya S. A. Cell mechanisms of antracycline cardiomyopathy under antibiotic doxorubicin treatment 83

Matsiuk Ya. R., Paramonava N. S., Karcheuski A. A., Baraban O. V. Morphological and histochemical characteristics of exocrine cells of the gastric mucosa in children with chronic gastritis at the dysplasia of the connective tissue 90

Zhukova T., SmeyanovichA., Bezubik S., Kyznetsov O. Mechanisms of growth of transformed neuroepithelial tumors 97

Mironova G. P., Pashkevich S. G. Impact of the intranasal application of gamma-aminobutyric acid on the memory processes of rats under hypoxia conditions 103

Pashkevich S. G., Tokalchik D. P., Mironova G. P., Dosina M. O., Tichonovich O. G., Stukach Yu. P., Kalyunov V. N. Implementation of the vital functions of rats after the reorganization of the neural hippocampus circuitry by mesenchymal stem cells 111

Shevela T. L., Pohodenko-Chudakova I. O. Immunoassay effectiveness for determining of antibodies to *Helicobacter pylori* in the oral fluid of patients with periimplantitis 118

Bon E. I., Zimatkin S. M. Organellogenesis features in the neurons of the cerebral cortex of rats after prenatal alcoholization 123

ISSN 1814-6023 (print)

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 616.41-018.4:616.36-018]-092.4

Поступила в редакцию 27.09.2016
Received 27.09.2016

А. А. Коритко, С. И. Кривенко, А. Е. Щерба, Е. А. Примакова, А. А. Гомон, Е. Г. Петровская, Н. И. Дедюля, Е. С. Бузук

Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей на базе 9-й городской клинической больницы, Минск, Республика Беларусь

РОЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПОДДЕРЖАНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ *IN VITRO*

Изучено влияние мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из жировой ткани, на жизнеспособность и функциональную активность гепатоцитов в совместной с МСК культуре. Установлено, что метод монокультивирования выделенных из печени гепатоцитов не обеспечивает увеличения количества этих клеток и приводит к снижению их жизнеспособности с 98 % на 1-е сутки до 15 % на 7-е сутки. Синтез секреторных белков печени HGF и ANGPTL4 свидетельствует о возможности использования МСК в качестве подложки для поддержания функциональных свойств изолированных гепатоцитов в процессе культивирования. Следовательно, совместное культивирование МСК, выделенных из жировой ткани, и изолированных клеток печени способствует сохранению клеточного трансплантата в течение определенного периода времени в сравнении с монокультурой гепатоцитов. Вспомогательная роль МСК особенно перспективна в контексте клеточной трансплантации при острой печеночной недостаточности, при которой совместное введение МСК и гепатоцитов может не только обеспечивать поддержку функциональной активности печени, но и оказывать противовоспалительное действие.

Ключевые слова: гепатоциты, мезенхимальные стволовые клетки, совместное культивирование, уровень секреции растворимых протеинов печени, морфологические характеристики, клеточная трансплантация.

A. A. Karytka, S. I. Krivenko, A. E. Shcherba, Y. A. Prymakova, A. A. Homan, K. G. Pyatrouskaya, N. I. Dzyadzyulya, E. S. Buzuk

Republican Scientific and Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, the 9th Minsk City Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus

ROLE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN MAINTAINING THE VIABILITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEPATOCYTE CULTURE *IN VITRO*

The research results of the influence of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from adipose tissue on the viability and the functional activity in the co-culture of hepatocytes. It was established that the method of culturing hepatocytes isolated from the liver does not provide a larger number of these cells and leads to decrease in the viability from 98 to 15 % on the 1st day and on the 7th day, respectively. Synthesis of liver secretory proteins HGF and ANGPTL4 demonstrates the possibility of using MSCs as the substrate to maintain the functional properties of isolated hepatocytes during cultivation. Therefore, the co-culturing of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and isolated liver cells promotes cell transplant preservation for a certain period of time as compare with the monoculture of hepatocytes. The auxiliary role of mesenchymal stem cells is particularly promising in the context of cell transplantation for acute liver failure, in which the co-transplantation of MSC and hepatocytes may provide an optimal combination of the functional activity of liver support with anti-inflammatory action.

Keywords: hepatocytes, mesenchymal stem cells, co-culture, level of liver secretory soluble proteins, morphological characteristics, cell transplantation.

Введение. Печень является важным органом, выполняющим функции синтеза белка, метаболизма экзогенных и эндогенных субстратов. Совершенствование методов лечения острой и хронической печеночной недостаточности (ПН) является актуальной задачей современной медицины. Ортотопическая и вспомогательная трансплантация печени остается наиболее эффек-

тивным методом помощи пациенту при необратимом повреждении этого органа [1, 2]. Возрастающая во всем мире нехватка донорского материала, а также значительные экономические затраты, связанные с пересадкой печени, необходимость иммуносупрессии и большой риск для реципиентов приводят к необходимости развивать клеточные технологии и методы тканевой инженерии. Для лечения заболеваний печени разрабатываются клеточные технологии: экстракорпоральная искусственная печень, клеточная трансплантация и тканевая инженерия [3].

Перспективным средством терапии ПН может быть трансплантация гепатоцитов, которая позволяет восстановить функции печени без пересадки либо дождаться солидной трансплантации пациентам, находящимся в листе ожидания, особенно при метаболических болезнях печени, для которых требуется меньшее количество трансплантируемых клеток. Пересаженные гепатоциты обеспечивают функцию печени вместо поврежденного органа. Генная терапия печени позволяет селективно лечить нарушения, связанные с дефицитом определенных белков (например, альфа-1-антитрипсина), тирозинемию и др. В этом случае предполагаемый подход будет заключаться в комбинации трансфера гена *ex vivo* и аутотрансплантации трансфицированных гепатоцитов. Во всех случаях необходимым требованием является адекватная поддержка выживания и пролиферации гепатоцитов и обеспечение стабильности их специфических функций. Основным преимуществом трансплантации гепатоцитов является способность криоконсервировать клетки, после того как они изолированы от печени доноров. Клетки хранятся в жидком азоте и при необходимости могут быть размморожены для использования, когда они понадобятся, что является важным при лечении острой ПН [4]. Но криоконсервирование может оказывать негативное воздействие на жизнеспособность и адгезивные способности клеток, препятствуя таким образом их приживлению. В ряде недавних исследований изучены способности мезенхимальных стволовых клеток (МСК) оказывать структурную и трофическую поддержку изолированным клеткам печени в культуре *in vitro* с сохранением их жизнеспособности и функциональной активности [5, 6].

МСК – мультипотентные, фибробластоподобные клетки, обеспечивающие поддержку гемопоэтических клеток в костном мозге. Они являются доступным источником стволовых клеток и могут быть выделены из пуповинной крови, плаценты, жировой ткани и других источников. МСК играют важную роль в восстановлении тканей и обладают локальным иммуносупрессивным эффектом, поэтому их использование является предпочтительным для улучшения выживаемости пересаженных совместно с ними клеток. МСК также оказывают антиапоптотический и прорегенеративный эффекты, что указывает на перспективность их применения в комплексной терапии инфаркта миокарда, почечной недостаточности и инсульта.

МСК дифференцируются в гепатогенном направлении в соответствующих условиях *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, они могут корректировать повреждение печени и стимулировать ее регенерацию, что продемонстрировано на моделях животных и в нескольких проспективных клинических исследованиях с участием пациентов с печеночной недостаточностью [7]. До сих пор не до конца изучена способность МСК дифференцироваться в гепатоциты под влиянием соответствующего микроокружения и оказываемый ими терапевтический эффект.

Цель данного исследования – изучить влияние мезенхимальных стволовых клеток на жизнеспособность и функциональную активность гепатоцитов путем совместного культивирования мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, полученной от третьего донора в процессе мультиорганного забора, со свежеизолированными клетками печени.

Материалы и методы исследования. Для изоляции гепатоцитов из донорской печени применяли трехступенчатую перфузию органа и обработку его ферментативным раствором с последующей механической экстракцией. Все растворы нагревали до 37 ºС. Во фрагмент печени по предварительно заканюлированным сосудам вводили 500 мл раствора для перфузии 1, состоящего из раствора Хэнкса и 250 мМ EDTA. Далее вводили 500 мл раствора Хэнкса (раствор для перфузии 2) и производили обработку перфузионным раствором 3, содержащим коллагеназу II или IV типа (растворяется в DMEM-F12). Фрагмент печени выдерживали 30 мин в растворе для перфузии 3 при постоянном перемешивании на шейкере при 37 ºС, после чего фермент нейтрализовали охлажденным до 4 ºС раствором BME с 10 % человеческого альбумина. Обработанную коллагеназой ткань измельчали на мелкие кусочки путем механической гомогенизации скальпе-

лем, после чего дважды пропускали через слой стерильной марли. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 4 мин при 4 ºС. Супернатант собирали, а клеточный осадок ресуспендировали в 50 мл охлажденной среды для отмывки. Процедуру центрифугирования повторяли дважды в течение 4 мин при 4 ºС. Осадок ресуспендировали в 5–10 мл среды для культивирования гепатоцитов. Подсчет клеток и определение жизнеспособности производили по стандартной методике по исключению трипанового синего. Полученные клетки печени могут быть использованы для введения пациентам с ПН либо криоконсервированы с целью применения для последующей терапии.

Выделение МСК из жировой ткани проводили по ранее разработанному протоколу с некоторыми модификациями [8]. Липоаспират смешивали с равным объемом стерильного раствора фосфатно-солевого буфера (PBS) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Образовавшийся поверх PBS слой адипоцитов собирали в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 50 мл. Полученную суспензию смешивали с равным объемом 0,06 %-ного раствора коллагеназы I типа в PBS и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37 °С и легком помешивании, после чего фермент нейтрализовали путем добавления к смеси равного объема среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), содержащей 10 % сыворотки AB(IV) или 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Полученную смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Осадок собирали и ресуспендировали в 50 мл среды DMEM. Процедуру центрифугирования повторяли при 1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Осадок ресуспендировали в 10–15 мл среды для культивирования МСК. Подсчет клеток производили по стандартной методике с уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим. Жизнеспособность клеток оценивали по общепринятой методике по исключению трипанового синего. Клеточную суспензию доводили средой для культивирования МСК до посевной концентрации и высевали в культуральные флаконы. Через 24–48 ч инкубации (37 °С, 5 % CO_2, 90 % влажности) не адгезировавшиеся к поверхности флакона клетки смывали стерильным PBS и заполняли флаконы специализированной средой для культивирования МСК. Замену среды в объеме 1/2 от первоначального производили каждые 3–4 дня до достижения клетками 70–80 % конфлюэнтности.

Для совместного культивирования МСК и изолированных клеток печени МСК предварительно высевали в культуральные флаконы в количестве $5 \cdot 10^3$ клеток/см^2 и культивировали до достижения 70–80 % конфлюэнтности. После этого в культуру МСК добавляли только что выделенные гепатоциты в концентрации 1,5 млн/мл. Совместное культивирование проводили в среде IMDM (Invitrogen Corp., США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % L-глутамина, 1 % раствора антибиотиков. Среду меняли каждые 24 ч, проводили сбор супернатантов и их заморозку при –80 ºС для последующего анализа. Культуры МСК и изолированных гепатоцитов использовали в качестве контролей.

Для статистической обработки применяли пакеты программ Statistica 6.0 (непараметрические методы) и Excel 2007.

Результаты и их обсуждение. Фракцию мононуклеарных клеток выделяли по ранее разработанному модифицированному протоколу с использованием экстракорпоральной механической обработки жировой ткани (ЖТ). Для всех образцов МСК, выделенных из жировой ткани, в процессе культивирования проанализирована экспрессия маркеров клеточной поверхности методом проточной цитофлуориметрии для подтверждения принадлежности клеток к мезенхимальным стволовым. Для иммунофенотипирования МСК ЖТ выбран спектр маркеров, наиболее часто экспрессируемых на стромальных стволовых клетках: CD90, CD105, CD13, CD44, CD45, CD73, CD34, CD54, CD29, CD9. МСК ЖТ образцов, описанных ниже, характеризовались стабильно высокими уровнями стромально-ассоциированных маркеров (CD90, CD105, CD13, CD44, CD73, CD29, CD9) и низким уровнем CD34. Исследуемые клетки были негативны по маркерам CD45 и HLA-DR.

Для изучения совместного культивирования гепатоцитов и МСК использовали 9 образцов печени, полученных в процессе мультиорганного забора, и 2 образца – после операции по резекции фрагмента печени.

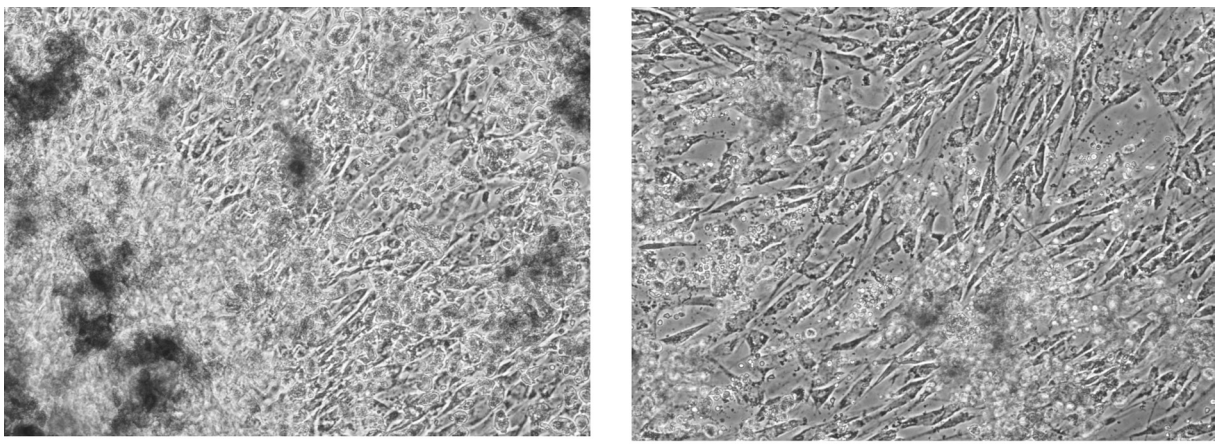
Морфологический анализ клеточных культур гепатоцитов проводили через 18 ч после их выделения, определяли наличие клеток, по морфологии которых можно судить о принадлежности их к популяции гепатоцитов. Через 72 ч количество клеток данной популяции снижалось, а к 7-м суткам наблюдалась полная утрата свойств клеток печени, что подтверждено данными иммунофенотипического анализа.

Метаболическую активность выделенных гепатоцитов оценивали методом количественного колориметрического анализа уровня продукции мочевины в клеточном супернатанте на 1, 3, 7 и 10-е сутки после процедуры изоляции клеток печени. Наличие мочевины в культуральной среде, наряду с морфологическими характеристиками, свидетельствовало о принадлежности выделенных клеток к гепатоцитам, а постепенное уменьшение концентрации данного продукта жизнедеятельности клеток в образце – о снижении метаболической активности гепатоцитов. Это соответствовало результатам иммунофенотипического и морфологического анализа и данным многочисленных литературных источников. Большинство образцов имели схожий уровень продукции мочевины с тенденцией к его увеличению на 10-е сутки культивирования, что может свидетельствовать о постепенной гибели клеток и выделении продуктов их распада.

Использование МСК в качестве подложки для культивирования является одним из новейших подходов в получении клеточного трансплантата клеток печени. Проведено исследование по влиянию МСК на полученный трансплантат гепатоцитов путем создания сложных совместных культур. Для культивирования совместных культур использовалось два вида подложки: 1) дифференцированные в гепатогенном направлении мезенхимальные клетки; 2) достигшие монослоя культуры МСК.

Культивирование изолированных из печени гепатоцитов на монослое МСК позволяет решить проблему, связанную с чрезмерной адгезией полученных клеток ко дну обычных культуральных флаконов. Процесс «снятия» гепатоцитов со дна адгезивных флаконов без подложки трудоемок, требует использования специальных ферментов (диспазы или акутазы) и длительной инкубации в энзимном растворе, что приводит к частичной утрате свойств этих клеток.

На подготовительном этапе необходимо получение культуры МСК (размораживание ранее банкированного клеточного трансплантата либо использование образца МСК, находящегося в процессе культивирования). В эксперименте с применением культуры дифференцированных в гепатогенном направлении МСК отбирались образцы, соответствующие как первому, так и второму этапу протокола дифференцировки (рис. 1, *a*, *b*).



a *b*

Рис. 1. Совместное культивирование изолированных клеток печени и МСК: *a* – изолированные клетки печени образца № 3 и МСК ЖТ (пассаж 3) в культуре через 10 сут после изоляции; *b* – изолированные клетки печени и МСК ЖТ (пассаж 2) (дифференцировка: шаг 1, 7-е сутки) в культуре через 3 сут после изоляции. ×100, фазовый контраст

Fig. 1. Co-culture of isolated liver cells and MSCs: *a* – isolated liver cells of sample No. 3 and MSC AT (passage 3) in culture in 10 days before, after isolation; *b* – isolated liver cells and MSCs AT (passage 2) (differentiation: step 1, day 7) in the culture in 3 days after isolation. × 100, phase contrast

Трипсинизация совместной культуры протекала по стандартной методике, применяемой для получения клеточного трансплантата МСК, что позволяло повысить жизнеспособность гепатоцитов путем снижения времени агрессивного воздействия фермента.

Кроме изучения морфологических характеристик исследован уровень секреторной активности изолированных гепатоцитов (n = 11), совместных культур МСК + гепатоциты (n = 11). Уровни протеинов, секретируемых выделенными клетками печени, определены на приборе для мультиплексного анализа Luminex 200TM. Концентрация белков – AFP, ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL6, FABP, FGF-19, FGF-21, FGF-23 и HGF – измерена в 76 пробах.

Для анализа полученных данных применяли непараметрический метод Манна–Уитни (STATISTICA 6.0). Установлены статистически значимые различия по секреторной активности ANGPTL4 (p = 0,003) и HGF (p = 0,005) (рис. 2, 3). По уровню секреции альфа-фетопротеина не установлено статистически достоверных различий (p > 0,05) между группами (значения медиан представлены в таблице).

Уровень секретируемых белков в образцах изолированных гепатоцитов и в совместных культурах мезенхимальных стволовых клеток и гепатоцитов

The level of secreted proteins in isolated hepatocytes samples and in co-cultures of mesenchymal stem cells and hepatocytes

Клетки	ANGPTL4, нг/мл	HGF, нг/мл	AFP, нг/мл
Гепатоциты	3,86 (2,00; 24,40)	0,23 (0,14; 0,34)	0,25 (0,08; 0,64)
МСК + гепатоциты	14,28 (7,71; 71,33)	0,36 (0,23; 0,94)	0,26 (0,07; 2,50)

Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии МСК на уровень секреции протеинов печени и о поддержании функциональных и метаболических свойств изолированных гепатоцитов.

Изучено влияние микроокружения гепатоцитов, находящихся в культуре на МСК (изменение метаболической активности, иммунофенотипических характеристик). По изменению уровня генной экспрессии альфа-фетопротеина, цитохрома (CYP2E1, CYP3A4) проанализирована способность МСК дифференцироваться в гепатогенном направлении.

Совместное культивирование МСК ЖТ и клеток печени способствовало сохранению клеточного трансплантата в течение определенного периода времени в сравнении с монокультурой

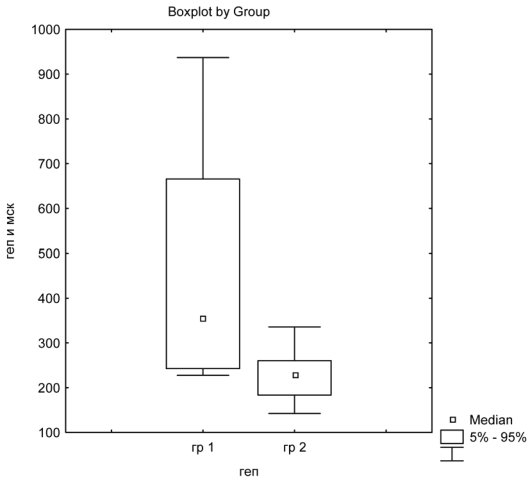


Рис. 2. Уровень секреторной активности HGF изолированных гепатоцитов (n = 11) и культур МСК + гепатоциты (n = 11) (p < 0,005)

Fig. 2. The level of the HGF secretory activity of isolated hepatocytes (n = 11) and co-cultures of MSCs + hepatocytes (n = 11) (p < 0.005)

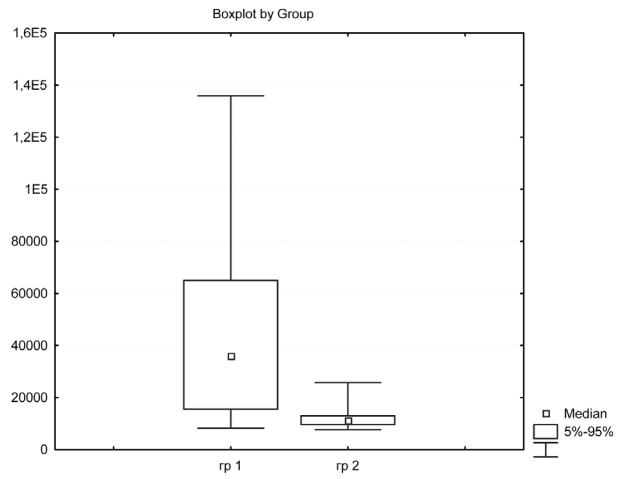


Рис. 3. Уровень секреторной активности ANGPTL4 изолированных гепатоцитов (n = 11) и культур МСК + гепатоциты (n = 11) (p < 0,003)

Fig. 3. The level of the secretory activity of ANGPTL4 of isolated hepatocytes (n = 11) co-cultures of MSCs + hepatocytes (n = 11) (p < 0.003)

гепатоцитов. Это достигается за счет снижения гибели клеток (в частности, апоптоза гепатоцитов) и повышения их выживаемости. Предположительно это обусловлено паракриновыми факторами, вырабатываемыми МСК под действием гепатоцитов.

Ранее проведенные исследования показали, что выделенные из костного мозга МСК оказывают защитное действие на гепатоциты грызунов *in vitro* и *in vivo*. Группой исследователей под руководством Исода установлено, что эти клетки поддерживают функцию гепатоцитов путем секреции IL-6, отвечающего за усиление продукции мочевины при сохранении концентрации альбумина на прежнем уровне [9]. Результаты трансплантации мышам человеческих гепатоцитов, культивированных совместно с МСК костного мозга, проведенной другой научной группой во главе с Махаджерани, показали улучшение приживления по сравнению с монокультурой клеток печени [10]. МСК, как известно, являются структурной опорой для клеток организма и обладают антиапоптическим, иммуномодулирующим действием. Кроме того, изучение совместного культивирования МСК костного мозга, гепатоцитов крысы и лимфоцитов человека показало, что присутствие лимфоцитов в совместной культуре влияет на функциональную активность гепатоцитов и развитие противовоспалительного ответа [11]. Данный эффект является результатом запуска комбинированного ответа, опосредованного межклеточными контактами и растворимыми факторами (факторы роста, цитокины внеклеточного матрикса) [12].

Таким образом, вспомогательная роль МСК особенно перспективна в контексте клеточной трансплантации при острой ПН. Трансплантация гепатоцитов может выступать в роли моста для регенерации родной печени либо поддерживающей терапии у пациентов в предтрансплантационном периоде, обеспечивая достаточное время для поиска подходящего органа. Имеются данные, что МСК могут служить потенциальной альтернативой трансплантации гепатоцитов при острой ПН. Несмотря на способность МСК ускорять процесс восстановления печени, они не всегда способны обеспечить поддержание ее функций на необходимом уровне. Совместная трансплантация МСК и гепатоцитов при острой ПН может не только обеспечивать поддержку печени, но и оказывать противовоспалительное действие.

Выводы

1. Метод культивирования выделенных из печени гепатоцитов не обеспечивает увеличения количества клеток и приводит к снижению их жизнеспособности с 98 (96–100) % на 1-е сутки до 15 (10–28) % на 7-е сутки. Синтез секреторных белков печени HGF ($p = 0{,}005$) и ANGPTL4 ($p < 0{,}003$) свидетельствует о возможности использования МСК в качестве подложки для поддержания функциональных свойств изолированных гепатоцитов в процессе их культивирования.

2. Совместная трансплантация МСК и гепатоцитов в качестве клеточной терапии при острой ПН не только обеспечивает поддержку печени, но и оказывает противовоспалительное действие.

3. Впервые дана оценка применения МСК, дифференцированных в гепатогенном направлении, в процессе совместного культивирования с изолированными гепатоцитами с целью поддержания их жизнеспособности и функциональной активности.

Список использованных источников

1. Transplantation of human hepatocytes / S. C. Strom [et al.] // Transplant. Proc. – 1997. – Vol. 29. – P. 2103–2106.

2. Strom, S. C. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease / S. C. Strom, J. R. Chowdhury, I. J. Fox // Semin. Liver Dis. – 1999. – Vol. 19. – P. 39–48.

3. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges / A. Dhawan [et al.] // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2010. – Vol. 7. – P. 288–298.

4. Analysis of the effects of cryopresentation on rat hepatocytes using SELDI-TOF mass spectrometry / C. Terry [et al.] // Cell Transplant. – 2006. – Vol. 15. – P. 35–43.

5. Houllhan, D. D. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease / D. D. Houllhan, P. N. Newsome // Gasrtoenterology. – 2008. – Vol. 135. – P. 438–450.

6. Fitzpatrick, E. Coculture with mesenchymal stem cells results in improved viability and function of human hepatocytes / E. Fitzpatrick, Y. Wu, P. Dhadda // Cell Transplantation. – 2015. – Vol. 1 (24). – P. 73–83.

7. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers / I. Aurich [et al.] // Gut. – 2007. – Vol. 56. – P. 405–415.

8. Способ получения мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека: пат. 18051 Респ. Беларусь / С. И. Кривенко, Е. С. Бузук, Н. И. Дедюля; дата публ.: 25.11.2013.

9. Maintenance of hepatocyte functions by coculture with bone marrow stromal cells / K. Isoda [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2004. – Vol. 97. – P. 343–346.

10. Transplant of primary human hepatocytes cocultured with bone marrow stromal cells to SCID Alb-uPA mice / S. A. Mohajerani [et al.] // Cell Medicine, Part B of Cell Transplantation. – 2010. – Vol. 1. – P. 81–92.

11. Effects of two mesenchymal cell pooulations on hepatocytes and lymphocytes / A. Gomez-Aristizabal [et al.] // Liver Transpl. – 2012. – Vol. 18. – P. 1384–1394.

12. IFATS collection: *in vivo* therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury / D. Banas [et al.] // Stem. Cells. – 2008. – Vol. 26. – P. 2705–2712.

References

1. Strom S. C., Fisher R. A., Rubinstein W. S., Barranger J. A., Towbin R. B., Charron M., Mieles L., Pisarov L. A., Dorko K., Thompson M. T., Reyes J. "Transplantation of human hepatocytes", *Transplant Proceedings*, 1997, no. 29, pp. 2103–2106.

2. Strom S. C., Chowdhury J. R., Fox I. J. "Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease", *Seminars in Liver Disease*, 1999, no. 19, pp. 39–48.

3. Dhawan A., Puppi J., Hughes R. D., Mitry R. R. "Human hepatocyte transplantation: current experience, future challenges", *Nature Reviews Gastroenterology, Hepatology*, 2010, no. 7, pp. 288–298.

4. Terry C., Bailey M., Mitry R. R., Lehec S. C., Dhawan A., Hughes R. D. "Analysis of the effects of cryopresentation on rat hepatocytes using SELDI-TOF mass spectrometry", *Cell Transplantation*, 2006, no. 15, pp. 35–43.

5. Houllhan D. D., Newsome P. N. "Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease", *Gasrtoenterology*, 2008, no. 135, pp. 438–450.

6. Fitzpatrick E., Wu Y., Dhadda P. "Coculture with mesenchymal stem cells results in improved viability, function of human hepatocytes", *Cell Transplantation*, 2015, no. 1, pp. 73–83.

7. Aurich I., Mueller L. P., Aurich H., Luetzkendorf J., Tisljar K., Dollinger M. M., Schormann W., Walldorf J., Hengstler J. G., Fleig W. E., Christ B. "Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers", *Gut*, 2007, no. 56, pp. 405–415.

8. Krivenko S. I., Buzuk E. S., Dedyulya N. I. Gosudarstvennoe uchrezhdenie "Respublikanskii nauchno-prakticheskii tsentr transfuziologii i meditsinskikh biotekhnologii", Uchrezhdenie zdravookhraneniya "9-ya gorodskaya klinicheskaya bol'nitsa", *Sposob polucheniya mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok iz zhirovoi tkani cheloveka* [A method of obtaining mesenchymal stem cells from the human fat tissue, Republic of Belarus, Baza patentov Belarusi, BY, Pat. 18051, 2013.

9. Isoda K., Kojima M., Takeda M., Higashiyama S., Kawase M., Yagi K. "Maintenance of hepatocyte functions by coculture with bone marrow stromal cells", *Journal of Bioscience, Bioengineering*, 2004, no. 97, pp. 343–346.

10. Mohajerani S. A., Nourbakhsh M., Cadili A., Lakey J. R., Kneteman N. M. "Transplant of primary human hepatocytes cocultured with bone marrow stromal cells to SCID Alb-uPA Mice", *Cell Medicine, part B of Cell Transplantation*, 2010, no. 1, pp. 81–92.

11. Gomez-Aristizabal A., Ng C., Ng J., Davies J. E. "Effects of two mesenchymal cell populations on hepatocytes, lymphocytes", *Liver Transplantation*, 2012, no. 18, pp. 1384–1394.

12. Banas A., Teratani T., Yamamoto Y., Tokuhara M., Takeshita F., Osaki M., Kawamata M., Kato T., Okochi H., Ochiya T., "IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury", *Stem Cells*, 2008, no. 26, pp. 833–848.

Информация об авторах

Коритко Алла Александровна – врач лабораторной диагностики. Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей на базе 9-й городской клинической больницы (ул. Семашко, 8, 210045, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aleftyna@tut.by

Кривенко Светлана Ивановна – канд. мед. наук, доцент, зам. главного врача. 9-я городская клиническая больница (ул. Семашко, 8, 210045, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: svtl_kr@tut.by

Щерба Алексей Евгеньевич– канд. мед. наук, доцент, заведующий отделом. Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей на базе 9-й городской клинической больницы (ул. Семашко, 8, 210045, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aleina@tut.by.

Примакова Евгения Алексеевна – врач лабораторной диагностики. Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей на базе 9-й городской клинической больницы (ул. Семашко, 8, 210045, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: gane_sel@mail.ru

Information about the authors

Karytka Ala Alexandrovna – laboratory doctor. Republican Scientific and Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, the 9th Minsk City Clinical Hospital (8, Semashko Str., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aleftyna@tut.by

Krivenko Svetlana Ivanovna – Ph. D. (Med.), Associate professor, Deputy chief (head) doctor of science. 9th City Clinical Hospital (8, Semashko Str., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aleftyna@tut.by

Shcherba Aliaksei Evgen'evich – Ph. D. (Med.), Associate professor. Republican Scientific and Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, the 9th Minsk City Clinical Hospital (8, Semashko Str., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aleina@tut.by

Prymakova Yauheniya Alekseevna – laboratory doctor. Republican Scientific and Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, the 9th Minsk City Clinical Hospital, (8, Semashko Str., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gane_sel@mail.ru

Гомон Анастасия Алексеевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей на базе 9-й городской клинической больницы (ул. Семашко, 8, 210045, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: gomonanastasiya@gmail.com

Петровская Екатерина Геннадьевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей на базе 9-й городской клинической больницы (ул. Семашко, 8, 210045, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Ekatherina999@mail.ru

Дедюля Наталья Ивановна – заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей на базе 9-й городской клинической больницы (ул. Семашко, 8, 210045, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nata_2010@ tut.by

Бузук Евгения Сергеевна – врач лабораторной диагностики. Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей на базе 9-й городской клинической больницы (ул. Семашко, 8, 210045, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zhenik.r@gmail.com

Для цитирования

Роль мезенхимальных стволовых клеток в поддержании жизнеспособности и функциональной активности культуры гепатоцитов *in vitro* / А. А. Коритко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 7–14.

Homan Anastasiya Alekseevna − Junior scientific researcher. Republican Scientific and Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, the 9th Minsk City Clinical Hospital (8, Semashko Str., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gomonanastasiya@gmail.com.

Piatrouskaya Katsiaryna Genad'evna − Scientific researcher. Republican Scientific and Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, the 9th Minsk City Clinical Hospital (8, Semashko Str., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Ekatherina999@mail.ru

Dzyadzyulya Natallya Ivanovna − Chief of the laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, the 9th Minsk City Clinical Hospital (8, Semashko Str., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nata_2010@ tut.by

Buzuk Evgenia Sergeevna − laboratory doctor. Republican Scientific and Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, the 9th Minsk City Clinical Hospital (8, Semashko Str., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zhenik.r@gmail.com

For citation

Karytka A. A., Krivenko S. I., Shcherba A. E., Prymakova Y. A., Homan A. A., Pyatrouskaya K. G., Dzyadzyulya N. I., Buzuk E. S. "Role of mesenchymal stem cells in maintaining the viability and functional activity of hepatocyte culture *in vitro*". *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 7–14.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616-099:547.263:517.112.385.2-092.9

Поступила в редакцию 09.11.2016
Received 09.11.2016

Ф. И. Висмонт, В. В. Лобанова

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

РОЛЬ КЛЕТОК КУПФЕРА И L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ И РАЗВИТИИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

В опытах на крысах показано, что хроническая этаноловая интоксикация сопровождается активацией клеток Купфера, угнетением процессов детоксикации, увеличением содержания продуктов перекисного окисления липидов в крови и печени и уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови, а также повышением активности аланин- и аспартатаминотрансфераз. Угнетение активности купферовских клеток гадолиния хлоридом, как и депрессия NO-синтазы метиловым эфиром N^G-нитро-L-аргинина, ослабляет токсическое действие этанола на печень, а также развитие характерных изменений в процессах перекисного окисления липидов, детоксикации, уровня NO_3^-/NO_2^-, активности аланин- и аспартатаминотрансфераз в плазме крови и температуры тела при хронической алкоголизации крыс. Активность клеток Купфера, L-аргинин-NO системы и процессов образования монооксида азота являются важными факторами в механизмах реализации влияния этанола на детоксикацию и процессы перекисного окисления липидов в печени.

Ключевые слова: клетки Купфера, L-аргинин-NO система, монооксид азота, хроническая этаноловая интоксикация, детоксикация, гадолиния хлорид, перекисное окисление липидов.

F. I. Vismont, V. V. Lobanova

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

ROLE OF THE KUPFFER CELLS AND THE L-ARGININE-NO SYSTEM IN DETOXICATION PROCESSES AND OXIDATIVE STRESS IN THE RAT'S LIVER WITHIN CHRONIC ALCOHOLIZATION

In experiments on rats it was shown that chronic ethanol intoxication causes Kupffer cells activation, depression of detoxication processes, increase in the content of lipid peroxidation products in blood and liver, the level of NO_3^-/NO_2^- and the activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in plasma. Inhibition of the activity of Kupffer cells by gadolinium chloride, as NO-syntase activity by L-NAME, reduces the toxic effect of ethanol on the liver, as well as the development of typical changes in the processes of lipid peroxidation, detoxication, the levels of NO_3^-/NO_2^- in blood plasma in rats with chronic alcoholization. The functional state of Kupffer cells and the L-arginine-NO system activity, the nitric oxide production is the important factors of realizing the ethanol influence on detoxication and peroxidation processes in the liver.

Keywords: Kupffer cells, L-arginine-NO system, nitric oxide, chronic ethanol intoxication, detoxication, gadolinium chloride, lipid peroxidation.

Введение. Одной из актуальнейших проблем современной медицины, имеющей государственную значимость, является неуклонный рост алкогольной патологии, приводящей к сокращению продолжительности жизни и отрицательно сказывающейся на состоянии здоровья.

Заболеваемость и смертность при регулярном потреблении алкогольных напитков связана с токсическим воздействием этанола на важнейшие органы человека и в первую очередь на печень [1]. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что токсические метаболиты этанола, активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), развитие оксидативного (окислительного) стресса вносят весомый вклад в поражение печени, вызванное действием этанола [1, 2].

Степень выраженности цитолитического синдрома, как установлено рядом авторов, напрямую связана с реактивностью печеночных макрофагов – клеток Купфера (КК) [3, 4]. Показана значимость КК в развитии оксидативного стресса [5–7] и особенно для избыточной продукции различных активных цитотоксических веществ, в частности монооксида азота (NO) [4]. В то же время малочисленность исследований по выяснению роли КК в механизмах алкогольного повреждения печени свидетельствует лишь о накоплении фактов в подтверждение этого предпо-

© Висмонт Ф. И., Лобанова В. В., 2017

ложения. Данные о влиянии КК и L-аргинин-NO системы, ответственной за образование NO [8], на процессы детоксикации и развитие оксидативного стресса при алкогольной интоксикации вообще отсутствуют, хотя участие КК и L-аргинин-NO системы в этих процессах вполне закономерно.

Цель работы – выяснить, какую роль играют клетки Купфера и монооксид азота в процессах детоксикации и в развитии оксидативного стресса в печени крыс при хронической алкоголизации.

Материалы и методы исследования. Опыты выполнены на 112 взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 180–220 г. Рацион крыс состоял из комбикорма КК-92/ПХЧ-5, количество которого определялось нормами кормления лабораторных животных. Питьевой режим соответствовал принципу ad libitum.

Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводили путем ежедневного интрагастрального введения животным 30 %-ного раствора этанола (из расчета 3,5 г 92 %-ного этанола на 1 кг массы) в течение 60 сут. Селективную депрессию КК вызывали путем введения внутрибрюшинно водного раствора гадолиния хлорида – $GdCl_3$ (Sigma, США) в дозе 10 мг/кг [7, 9]. Для выяснения роли NO в процессах детоксикации и развитии оксидативного стресса при этаноловой интоксикации использовали неселективный блокатор NO-синтазы – метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME). L-NAME (Sigma, США) вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NO_3^-/NO_2^-) [10].

В связи с тем, что в литературе имеются данные о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания уровня ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, опыты проводили в строго определенное время (с 8 до 12 ч утра).

О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), степени токсичности крови (СТК) и содержанию в плазме крови «средних молекул» (СМ), о ПНС (гексенал 100 мг/кг, внутрибрюшинно) – по времени нахождения животных в положении на боку. Для определения содержания в крови СМ использовали метод кислотно-этанольного осаждения, разработанный В. М. Моиным и соавт. [11], для оценки СТК – способ, предложенный О. А. Радьковой и соавт. [12]. Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в плазме крови определяли с помощью динитрофенилгидразинового метода, концентрацию общего белка и альбуминов в плазме – с использованием рефрактометрического метода.

Активность процессов ПОЛ в крови и печени оценивали по содержанию в них таких продуктов, как малоновый диальдегид (МДА), диеновые конъюгаты (ДК), основания Шиффа (ОШ). Концентрацию МДА, ДК и ОШ определяли спектрофотометрическим методом M. Mihára, M. Uchiyama [13], В. А. Костюка [14] и B. L. Fletcher с соавт. [15] соответственно.

Ректальную температуру измеряли электротермометром ТПЭМ-1. Забор крови и ткани печени для исследований производили сразу же после декапитации животных. Декапитацию производили через 1 ч после последнего введения этанола (опыт) или физраствора (контроль).

Все эксперименты выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными, а также с требованиями Директивы Европейского этического комитета 86/609/EEC от 24.11.1986 г. и «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и иных научных целях» от 18.03.1986 г. и ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь (№ 56 от 28.03.2008 г.).

Для статистической обработки полученных данных использовали пакеты прикладного программного обеспечения Statsoft (США) – Statistica 8.0, Microsoft Office Excell 2000, Graph Pad Prism4. Анализ выявленных в двух независимых группах различий между количественными показателями, распределение которых статистически значимо не отличалось от нормального, проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента в модификации Уэлча (Welch's test). Количественные показатели представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($\overline{X} \pm S_x$), качественные – в виде относительных величин. Различия между экспериментальными группами считали достоверными при $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что в условиях хронической этаноловой интоксикации у крыс угнетаются процессы детоксикации, снижаются температура тела, концентрация общего белка и альбуминов, повышаются уровень NO_3^-/NO_2^-, активность АлАТ и АсАТ в плазме крови, а также активируются процессы ПОЛ в крови и печени. Смертность животных через 60 сут ежедневного интрагастрального введения этанола составила 14 %.

Так, через 60 сут после ежедневного введения в желудок этанола ректальная температура у животных (n = 20) снизилась на 1,1 ± 0,14 °С (p < 0,05). При этом концентрация СМ в плазме крови крыс (n = 10) увеличилась на 38,5 % (p < 0,05), а СТК (n = 10) была на 57,8 % выше (p < 0,05), чем в контроле (через 60 сут после ежедневного интрагастрального введения физраствора). ПНС после хронической затравки этанолом возросла на 24,5 % по сравнению с таковой у животных контрольной группы (p < 0,05, n = 7). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС в контроле (ежедневное интрагастральное введение физраствора в течение 2 мес., n = 10) составили соответственно 0,69 ± 0,012 г/л, 1,3 ± 0,11 ед. и 27,8 ± 3,22 мин.

Опыты показали, что хроническая алкоголизация крыс (n = 8) приводит к снижению концентрации общего белка в плазме крови до 56,6 ± 1,5 г/л (на 12,2 %, p < 0,05). Содержание альбуминов у животных снизилось до 13,5 ± 1,1 г/л (на 28,7 %, p < 0,05). Активность АлАТ и АсАТ, важнейших показателей тяжести поражения печени, в крови алкоголизированных животных повысилась на 488,5 и 196,3 % по сравнению с контролем (p < 0,05) и составила 2,71 ± 0,13 и 1,77 ± 0,16 мккат/л соответственно.

Обнаружено, что действие этанола в организме животных в течение 60 сут сопровождается повышением в плазме крови уровней ДК, МДА и ОШ на 39,3 % (p < 0,05, n = 7), 58,5 % (p < 0,05, n = 8) и 50,8 % (p < 0,05, n = 7) соответственно. В печени содержание ДК возросло на 29,3 % (p < 0,05, n = 7), МДА – на 36,5 % (p < 0,05, n = 7), ОШ – на 23,3 % (p < 0,05, n = 7). У крыс контрольной группы (физраствор интрагастрально ежедневно в течение 60 сут, n = 8) содержание ДК, МДА и ОШ в плазме крови составило соответственно 0,59 ± 0,051 D_{233}/мл, 0,71 ± 0,058 мкМоль/мл и 5,4 ± 0,52 ЕД/мл, а в печени – 14,5 ± 1,38 D_{233}/г ткани, 17,1 ± 0,71 мкМоль/г ткани и 136,4 ± 13,5 ЕД/г ткани.

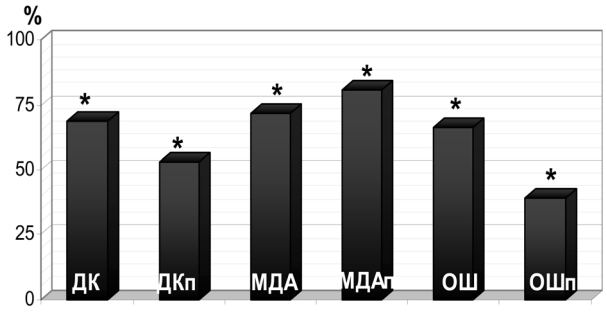
Выявлено, что в условиях хронической этаноловой интоксикации у животных изменяется в плазме крови концентрация NO_3^-/NO_2^- – конечных продуктов деградации NO [8, 10]. Интрагастральное введение этанола через 60 сут алкоголизации приводило к повышению уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови крыс (n = 8) до 11,02 ± 1,34 мкМоль/л (на 79,1 %, p < 0,05).

Действие $GdCl_3$ (10 мг/кг внутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 60 сут) достоверно не сказывалось на показателях детоксикации, содержании продуктов ПОЛ в плазме крови и печени, а также на активности АлАТ и АсАТ плазмы крови животных (n = 8). У крыс контрольной группы (n = 7), получавших интрагастрально 1 раз в неделю физраствор в течение 60 сут, активность АлАТ и АсАТ в плазме крови составляла соответственно 0,56 ± 0,04 и 0,69 ± 0,05 мккат/л, а у животных опытной группы (n = 8), получавших 1 раз в неделю внутрибрюшинно водный раствор $GdCl_3$ в течение 60 сут, – 0,49 ± 0,01 и 0,63 ± 0,03 мккат/л соответственно.

Опыты показали, что хроническая алкогольная интоксикация у крыс, которым предварительно, за 12 ч до интрагастрального введения этанола, вводили 1 раз в неделю в течение 60 сут внутрибрюшинно ингибитор КК $GdCl_3$ (10 мг/кг), сопровождается менее выраженными изменениями в процессах детоксикации и содержания продуктов ПОЛ в крови и печени животных (см. рисунок), а также менее значимым повышением в плазме крови уровней АлАТ, АсАТ, NO_3^-/NO_2^- и температуры тела.

Так, концентрация ДК в печени опытных животных (n = 8) была на 49,2 % (p < 0,05), а в плазме крови (n = 8) – на 35,5 % (p < 0,05) меньше, чем у животных контрольной группы (n = 8) после внутрибрюшинного введения физраствора и хронической алкоголизации. Содержание МДА в печени в этих условиях было меньше на 24,1 % (p < 0,05), а в плазме крови – на 29,7 % (p < 0,05). Уровень ОШ в печени и в плазме крови был ниже на 52,2 и 34,1 % соответственно (p < 0,05).

Установлено, что в результате ежедневного интрагастрального введения 30 %-ного раствора этанола в течение 60 сут уровень СМ в плазме крови и степень ее токсичности у крыс, которым 1 раз в неделю в течение 2 мес. предварительно (за 12 ч до введения этанола) внутрибрюшинно



Изменение (в % по отношению к контролю) содержания диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) и оснований Шиффа (ОШ) в плазме крови и печени у крыс с хронической этаноловой интоксикацией в условиях депрессии клеток Купфера ($GdCl_3$). * – изменения достоверны ($p < 0,05$) по отношению к контролю ($GdCl_3$ 10 мг/кг внутрибрюшинно 1 раз в неделю и физраствор интрагастрально ежедневно в течение 60 сут, $n = 8$)

Changes (in % in relation to control) in the content of diene conjugates (DC), malonial dealdehyde (MDA) and bases of Shiff (BS) in the plasma of blood and liver of rats suffering from choronic ethanol intoxication under the depression conditions of Kuffer cells ($GdCl_3$). * – the changes are reliable ($p < 0.05$) in relation to control ($GdCl_3$ 10 mg/kg intraperitoneally one a week and saline intragastrally every day during 60 days, $n = 8$)

вводили раствор $GdCl_3$ (10 мг/кг), были ниже по сравнению с контрольными (этанол интрагастрально ежедневно ($n = 8$) и физраствор внутрибрюшинно 1 раз в неделю ($n = 8$) в течение 60 сут) на 25,2 и 28,5 % соответственно ($p < 0,05$). ПНС (гексенал 100 мг/кг внутрибрюшинно) у крыс в условиях опыта уменьшалась по сравнению с аналогичным показателем у животных контрольной группы ($n = 9$) на 27,1 % ($p < 0,05$). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс ($n = 8$) в контроле (этанол интрагастрально ежедневно и физраствор внутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 60 сут) составили 1,13 ± 0,029 г/л, 2,8 ± 0,32 ед. и 35,2 ± 3,68 мин соответственно.

Активность АлАТ, АсАТ и уровень NO_3^-/NO_2^- в плазме крови у опытных животных ($n = 8$) по сравнению с контрольными (внутрибрюшинное введение физраствора и хроническая алкоголизация) были ниже на 65,5; 42,3 и 45,8 % ($p < 0,05$) и составляли 1,21 ± 0,05 мккат/л, 1,07 ± 0,10 мккат/л и 5,05 ± 0,53 мкМоль/л соответственно, а температура тела снизилась на 0,5 ± 0,12 °С ($p < 0,05$).

Выявлено, что действие ингибитора NO-синтазы L-NAME (ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 60 сут) в дозе 25 мг/кг (дозе, не влияющей на температуру тела) не приводит к достоверному изменению содержания основных продуктов ПОЛ в крови и печени.

Установлено, что действие этанола в условиях предварительной (за 30 мин до итрагастрального введения этанола в течение 60 сут) инъекции L-NAME в организм животных ведет к менее выраженному угнетению процессов детоксикации, чем у животных контрольной группы. ПНС, уровень СМ в плазме крови и СТК у опытных крыс ($n = 9$), подвергшихся хронической алкоголизации, по сравнению с животными контрольной группы (внутрибрюшинное введение физраствора и хроническая алкоголизация) были ниже на 27,1; 48,3 и 24,2 % соответственно ($p < 0,05$), а содержание альбумина и общего белка – выше на 19,3 и 12,7 % ($p < 0,05$). Активность АлАТ и АсАТ плазмы крови у крыс, подвергшихся хронической алкоголизации в условиях действия в их организме ингибитора NO-синтазы, по сравнению с таковой у животных контрольной группы была ниже соответственно на 37,5 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и 48,8 % ($p < 0,05$, $n = 7$), а содержание NO_3^-/NO_2^- – на 39,1 % ($p < 0,05$, $n = 7$).

Обнаружено, что хроническая этаноловая интоксикация у крыс ($n = 9$), предварительно получивших L-NAME, по сравнению с таковой у животных контрольной группы приводит к уменьшению количества ДК в печени на 39,2 % ($p < 0,05$), а в плазме крови – на 28,6 % ($p < 0,05$). Концентрация МДА в печени в этих условиях снижалась на 27,6 % ($p < 0,05$), в плазме крови – на 30,3 % ($p < 0,05$). Уровень ОШ снижался в печени и в плазме крови соответственно на 50,5 % ($p < 0,05$) и 36,7 % ($p < 0,05$).

Выявленные особенности изменений детоксикационной функции печени, процессов ПОЛ в крови и печени, а также уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови при хронической алкоголизации в условиях функциональной недостаточности КК дают основание заключить, что активность КК определяет выраженность процессов детоксикации и оксидативного стресса при хронической этаноловой интоксикации. Учитывая, что как депрессия КК $GdCl_3$, так и угнетение NO-синтазы L-NAME ослабляют гепатотоксическое действие этанола, а также то, что последний оказывает угнетающее влияние на процессы детоксикации и активность процессов ПОЛ, есть основания полагать, что продукция КК NO имеет значение в реализации влияния этанола на процессы детоксикации и ПОЛ в печени.

Выводы

1. Хроническая этаноловая интоксикация сопровождается у крыс активацией клеток Купфера, L-аргинин-NO системы, угнетением процессов детоксикации, повышением содержания в крови и печени продуктов перекисного окисления липидов, а в плазме крови – уровня NO_3^-/NO_2^-, активности аланин- и аспартатаминотрансфераз.

2. Угнетение активности клеток Купфера хлоридом гадолиния, как и депрессия NO-синтазы L-NAME, ослабляют токсическое действие этанола на печень и развитие характерных изменений в процессах перекисного окисления липидов, детоксикации, уровня NO_3^-/NO_2^-, активности аланин- и аспартатаминотрансфераз в плазме крови и температуры тела при хронической алкоголизации крыс.

3. Активность клеток Купфера, L-аргинин-NO системы и процессов образования NO играют существенную роль в механизмах реализации влияния этанола на процессы ПОЛ и детоксикации в печени у крыс.

Список использованных источников

1. Буко, В. У. Метаболические последствия алкогольной интоксикации / В. У. Буко, О. Я. Лукивская, А. М. Хоха. – Минск, 2005. – 208 с.

2. Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms / C. Moncada [et al.] // Mol. Pharmacol. – 1994. – Vol. 46. – P. 786–791.

3. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени: обзор / Д. Н. Маянский // Пат. физиология. – 1985. – № 4. – С. 80–86.

4. Тейлор, Б. С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции / Б. С. Тейлор, Л. Х. Аларсон, Т. Р. Биллиар // Биохимия. – 1998. – Т. 63, вып. 7. – С. 905–923.

5. Висмонт, Ф. И. О роли клеток Купфера и гепатоцитов в механизмах реализации влияния трийодтиронина на процессы детоксикации и регуляции температуры тела / Ф. И. Висмонт, С. А. Артюшкевич // Бел. мед. журн. – 2005. – Т. 13, № 3. – С. 45–47.

6. Висмонт, Ф. И. Роль клеток Купфера и α_1-антитрипсина плазмы крови в регуляции детоксикационной функции печени, формировании тиреоидного статуса и терморегуляции при бактериальной эндотоксинемии / Ф. И. Висмонт, М. А. Глебов // Мед. журн. – 2013. – № 4 (46). – С. 54–57.

7. Kupffer cells function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat / G. Tapra [et al.] // Free Radic. Res. – 1997. – Vol. 26 (3). – P. 267–279.

8. Scibior, D. Arginine-metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czeczot // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2004. – Vol. 58. – P. 321–332.

9. Volmar, B. Modulation of Kupfer cells activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats / B. Volmar, D. Rettinger, G. A. Wanner // Shock. – 1996. – Vol. 6, N 6. – P. 434–441.

10. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et al.] // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, N 6. – P. 892–896.

11. Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях: а. с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50; заяв. 02.11.87; опубл. 07.11.89 / В. М. Моин, В. В. Николайчик, В. В. Кирковский // Открытия. Изобрет. – 1989. – № 41. – С. 415.

12. Способ определения токсичности биологических жидкостей: а. с. 1146570 СССР, МКИ б Ol № 1/28; заяв. 18.06.84; опубл. 23.03.85 / О. А. Радькова, Г. А. Бояринов, И. Н. Балишина // Открытия. Изобрет. – 1985. – № 11. – С. 616.

13. Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, T. Uchiyama // Analyt. Biochem. – 1978. – Vol. 86, N 1. – P. 271–278.

14. Костюк, В. А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / В. А. Костюк // Вопр. мед. химии. – 1984. – № 4. – С. 125–127.

15. Fletcher, B. L. Fluorescent products of lipid peroxidation of mitohondria and microsomes / B. L. Fletcher, C. L. Dillard, A. L. Tappel // Analyt. Biochem. – 1973. – Vol. 52, N 1. – P. 1–9.

References

1. Buko V. U., Lukivskaya O. Ya., Khokha A. M. *Metabolicheskie posledstviya alkogol'noi intoksikatsii* [Metabolic consequences of alcohol intoxication], Minsk, 2005.

2. Moncada C., Torres V., Varghese G., Albano E., Israel Y. "Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms", *Molecular Pharmacology*, 1994, vol. 46, pp. 786–791.

3. Mayanskii D. N. "Kupffer cells and liver pathology: review", *Patologicheskaya fiziologiya* [Human Pathology], 1985, no. 4, pp. 80–86.

4. Teilor B. S., Alarson L. Ch., Billiar T. R. “Inducible synthase of nitrogen oxide in the liver: regulation and functions”, *Biokhimiya* [Biochemistry], 1998, vol. 63, no. 7, pp. 905–923.

5. Vismont F. I., Artyushkevich S. A. “On the role of the Kuppfer cells and hepatocytes in the mechanism of realization of the triiodothyronine influence on the processes of detoxication and temperature regulation of the body”, *Belorusskii meditsinskii zhurnal* [Belarusian Medical Journal], 2005, vol. 13, no. 3, pp. 45–47.

6. Vismont F. I., Glebov M. A. “Function of the Kupffer cells and α_1-antitrypsin of blood plasma in the regulation of the liver detoxication function, in the formation of the thyroid status and thermal regulation at bacterial endotoxinemia”, *Meditsinskii zhurnal* [Medical Journal], 2013, no. 4 (46), pp. 54–57.

7. Tapra G., Pepper I., Smok G., Videla L. A. “Kupffer cells function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat”, *Free Radical Research*, 1997, vol. 26 (3), pp. 267–279.

8. Scibior D., Czeczot H. “Arginine – metabolism, functions in the human organism”, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2004, vol. 58, pp. 321–332.

9. Volmar B., Rettinger D., Wanner G. A. “Modulation of Kupfer cells activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats”, *Shock*, 1996, vol. 6, no. 6, pp. 434–441.

10. Moshage H., Kok B., Huizenga J. R., Jansen P. L. “Nitrite, nitrate determinations in plasma: a critical evaluation”, *Clinical Chemistry*, 1995, vol. 41, no. 6, pp. 892–896.

11. Moin V. M., Nikolaichik V. V., Kirkovskii V. V. “A method of determining substances of the group of average molecules in biological fluids”: A. s. 1520445 SSSR, VRB F 01 no. 33/50, *Otkrytiya. Izobreteniya* [Discoveries. Inventions], 1987, no. 41, p. 415.

12. Rad’kova O. A., Boyarinov G. A., Balishina I. N. “A method of determining the toxicity of biological fluids”:, A. s. 1146570 SSSR, MKI b Ol no. 1/28, *Otkrytiya. Izobreteniya* [Discoveries. Inventions], 1985, no. 11, p. 616.

13. Mihara M., Uchiyama T. “Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test”, *Analytical Biochemistry*, 1978, vol. 86, no. 1, pp. 271–278.

14. Kostyuk V. A. “Spectrophotometric determination of conjugates”, *Voprosy meditsinskoi khimii* [Problems of Medical Chemistry], 1984, no. 4, pp. 125–127.

15. Fletcher B. L., Dillard C. L., Tappel A. L. “Fluorescent products of lipid peroxidation of mitohondria, microsomes”, *Analytical Biochemistry*, 1973, vol. 52, no. 1, pp. 1–9.

Информация об авторах

Висмонт Франтишек Иванович – чл.-кор., д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: *patfiz@bsmu.by*

Лобанова Валерия Валерьевна – соискатель кафедры патологической физиологии. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Vismont Frantishek Ivanovich – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: *patfiz@bsmu.by*

Lobanova Valeria Valerievna – Applicant of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: *patfiz@bsmu.by*

Для цитирования

Висмонт, Ф. И. Роль клеток Купфера и L-аргинин-NO системы в процессах детоксикации и развития оксидативного стресса у крыс при хронической этаноловой интоксикации / Ф. И. Висмонт, В. В. Лобанова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 15–20.

For citation

Vismont F. I., Lobanova V. V. “Role of Kupffer cells and L-arginine-NO system in detoxication processes and oxidative stress in rat’s liver within chronic ethanol intoxication”. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 15–20.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616.31+616.313]-006.6:089.844(476)

Поступила в редакцию 16.12.2016
Received 16.12.2016

В. В. Татчихин[1], И. В. Залуцкий[2], В. В. Аничкин[3]

[1]Гомельский областной клинический онкологический диспансер, Гомель, Республика Беларусь
[2]Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[3]Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Республика Беларусь

ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПАЦИЕНТОВ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ

Рак слизистой оболочки полости рта среди злокачественных новообразований занимает 6-е место по распространенности во всем мире. Зарубежные онкологи отдают предпочтение комбинированному методу лечения рака орофарингеальной области, при котором ведущая роль отводится оперативному вмешательству. В работе представлены результаты хирургического лечения 177 пациентов с локализацией рака в орофарингеальной области. Объем хирургической резекции зависел от локализации и распространенности рака на слизистой оболочке языка, дна полости рта и ротовой части глотки. В зависимости от объема выполненных резекций обследуемые были разделены на две группы: контрольную (95 пациентов, которым производили эндооральные резекции в пределах одной–двух анатомических структур) и основную (82 пациента, которым производили расширенные резекции в пределах не менее трех анатомических зон).

Обширные пострезекционные дефекты сопровождались нарушением жизненно важных функций: дыхания, речи, жевания, глотания. Вследствие нарушения функций травмировалась психика пациентов, что приводило к выраженной социальной дезадаптации и зачастую было причиной отказа от хирургического лечения. Образовавшиеся пострезекционные дефекты, не совместимые с жизнью, являлись абсолютным показанием к выполнению одномоментных реконструктивных операций. До и после хирургического лечения у всех пациентов оценены функции темпа речи и глотания.

Ключевые слова: орофарингеальный рак, хирургическое лечение рака орофарингеальной области, оценка речи и глотания после хирургического лечения.

V. V. Tatchikhin[1], I. V. Zalutskii[2], V. V. Anichkin[3]

[1]Gomel Regional Clinical Oncological Dispensary, Gomel, Republic of Belarus
[2]Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[3]Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

SURGICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE OROPHARYNGEAL AREA

Cancer of the mucous membrane of the oral cavity takes the 6th place in the prevalence among malignant neoplasms in the world. Foreign oncologists prefer a combined method in treatment of the cancer of the oropharyngeal area, in which the leading role is given to surgery.

The work presents the results of surgical treatment of 177 patients with localized cancer in the oropharyngeal area. The volume of surgical resection depended on the location and prevalence of cancer in the periglottis, the mouth floor and oropharynx. Depending on the volume of resection, the patients were divided into two groups: the control group consisted of 95 patients who underwent endoral resection within one or two anatomical structures; the main group consisted of 82 patients who underwent extended resection with simultaneous reconstructive surgery within no less than three anatomical areas.

Wherein the vast postresectional defects are formed, which are accompanied by the disorder of such vital functions as respiration, speech, chewing, and swallowing. Following the disorder of these functions, the mentality of patients is injured, resulting in social maladjustment that often becomes the reason for their refusal from surgery. Formed postresectional defects, which are incompatible with life, are an absolute indication for momentary reconstructive surgery.

Before and after surgical treatment, speech and swallowing function rates were measured in all the patients.

Keywords: cancer oropharynx, surgical treatment of cancer oropharynx, effects of speech and swallowing after surgical treatment.

Введение. Рак слизистой оболочки полости рта среди злокачественных новообразований занимает 6-е место по распространенности во всем мире [1]. В структуре общей онкологической заболеваемости в Беларуси удельный вес злокачественных опухолей полости рта составляет

© Татчихин В. В., Залуцкий И. В., Аничкин В. В., 2017

25 %, рак языка – 19,4 % [2]. Несмотря на то что рак слизистой оболочки языка и полости рта относится к визуальной форме новообразований, III и IV стадии заболевания выявляются у 60–70 % пациентов [3, 4]. Пик заболеваемости приходится на возраст 55–64 года, однако высокую долю среди заболевших (54,6 %) составляют лица трудоспособного возраста [2]. Одногодичная летальность от опухолей орофарингеальной локализации в 2013 г. составила 36,6 % [2].

Зарубежные онкологи отдают предпочтение комбинированному методу лечения рака орофарингеальной области, при котором ведущая роль отводится оперативному вмешательству [3, 4]. В зависимости от локализации и распространенности рака в орофарингеальной области выделяют внутриротовые и расширенные резекции пораженного органа [3–5]. Эндооральные резекции выполняют в пределах одной–двух анатомических структур, расширенные – в пределах не менее трех анатомических зон. При этом образуются обширные пострезекционные дефекты, что сопровождается нарушением жизненно важных функций: дыхания, речи, жевания, глотания [1, 3–5]. Вследствие нарушения функций травмируется психика пациентов, что приводит к выраженной социальной дезадаптации и зачастую является причиной отказа от хирургического лечения [6]. Образовавшиеся пострезекционные дефекты, не совместимые с жизнью, являются абсолютным показанием к выполнению одномоментных реконструктивных операций [7].

Существенным шагом в развитии пластической хирургии в первой половине XX в. явилось применение мигрирующего стебля Филатова. Однако важным недостатком реконструкции с помощью Филатовского стебля являлась длительность, многоэтапность пластической операции и отсутствие возможности устранять дефекты, различающиеся по площади и объему [8]. Применение методов пластики местными лоскутами, выкроенными с учетом регионарного кровообращения, сопровождалось неудачами в 66,7 % случаев [8]. Возможности реконструктивно-восстановительной хирургии значительно расширились после разработки способов пластики с использованием сложных лоскутов с осевым типом кровообращения или их аутотрансплантации с применением микрохирургической техники [9, 10]. Выбор донорской зоны для реконструкции пострезекционного дефекта является важным направлением в пластической хирургии, поскольку определяет положительные клинические результаты [11].

Таким образом, отсутствие единого мнения в вопросе использования разнообразных донорских тканевых комплексов в зависимости от локализации, размера и типа пострезекционных дефектов для восстановления функций глотания и речи послужило основанием для разработки новых методик восстановительных операций у данной категории пациентов.

Цель исследования – разработка методик для улучшения функциональных результатов хирургического лечения пациентов с плоскоклеточным раком в орофарингеальной области.

Материалы и методы исследования. Проведен анализ результатов хирургического вмешательства у 177 пациентов (161 мужчина, 16 женщин; возраст от 34 до 70 лет, медиана возраста – 55 (48; 62) лет), находившихся на лечении в отделении опухоли головы и шеи Гомельского областного клинического онкологического диспансера с 1994 по 2015 г. У всех пациентов морфологическая структура опухоли – плоскоклеточный рак.

Все пациенты были разделены на две группы. В контрольную группу вошли 95 (53,6 %) пациентов, из числа которых в зависимости от объема выполненных им внутриротовых резекций было сформировано три подгруппы для анализа проведенного лечения. В первой подгруппе при локализации опухоли в передней трети языка 5 (5,2 %) пациентам выполняли V-образную резекцию передней трети языка с одномоментной глоссопластикой слизисто-мышечными лоскутами [5, 12]. Во второй подгруппе при локализации опухоли на боковой поверхности тела языка 54 (56,8 %) пациентам производили половинную резекцию языка. В третьей подгруппе при локализации опухоли на боковой поверхности тела языка с распространением на дно полости рта 36 (37,8 %) пациентам производили половинную резекцию тела языка с электрорезекцией дна полости рта.

В основную группу вошли 82 (46,3 %) пациента, из числа которых в зависимости от локализации и распространенности опухолевого процесса были сформированы четыре подгруппы пациентов, которым выполняли расширенную резекцию и одномоментно – реконструктивно-восстановительную операцию. Первую подгруппу составил 31 (37,8 %) пациент, у которого опухоль

локализовалась во фронтальном отделе дна полости рта и распространялась на переднюю треть тела языка, тело нижней челюсти и на кожу подподбородочной области. Пациентам данной подгруппы производили расширенную резекцию в объеме фронтального отдела дна полости рта, V-образную резекцию передней трети тела языка, резекцию тела нижней челюсти, а при распространении опухоли на кожу подподбородочной области в блок удаляемых тканей включали участок кожи подподбородочной области. Выполняли одномоментную глоссопластику [12]. Для пластики полости рта использовали кожно-мышечный лоскут, взятый из большой грудной мышцы. При сквозном дефекте кожи подподбородочной области производили реконструкцию по разработанной нами методике [13]. Вторую подгруппу составили 30 (36,5 %) пациентов, у которых опухоль локализовалась во фронто-латеральном отделе дна полости рта и распространялась на боковую поверхность тела языка и тело нижней челюсти. Выполняли расширенную половинную резекции тела языка, дна полости рта, резекцию тела нижней челюсти. Для реконструкции полости рта использовали кожно-мышечный лоскут, взятый из большой грудной мышцы. Третью подгруппу составили 17 (20,7 %) пациентов с локализацией опухоли в орофарингеальной области и распространенностью опухолевого процесса на тело языка, дно, боковые стенки полости рта, тело нижней челюсти, ротовую часть глотки. Выполняли расширенную половинную резекцию тела языка, дна, боковой стенки полости рта, тела нижней челюсти, ротовой части глотки. Реконструкция заключалась в свободной трансплантации кожно-мышечного лучевого лоскута с применением микрохирургической техники [14] или в использовании кожно-мышечного лоскута, взятого из широчайшей мышцы спины. Четвертую подгруппу составили 4 (4,8 %) пациента, у которых опухоль локализовалась в области мягких тканей щеки. Расширенную резекцию мягких тканей щеки и пластику дефекта выполняли с применением микрохирургической техники, используя кожно-мышечной лучевой лоскут.

Статистическую обработку материалов работы проводили с помощью программы STATISTICA 6.0. Количественные показатели представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Уровень статистической значимости определен нами как $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. До и после выполнения хирургического вмешательства с помощью стандартного текста, состоящего из 200 слов, оценивали темп речи пациентов контрольной и основной групп. Пациентам предлагали читать данный текст в течение одной минуты (средний темп речи 100–120 слов в минуту считали нормальным) [15].

Из рис. 1 видно, что в первой подгруппе контрольной группы у пациентов с локализацией рака в передней трети языка и размере опухоли в пределах T1-2 различий в оценке темпа речи нет ($p = 0,564$). У пациентов второй подгруппы с локализацией рака на боковой поверхности тела языка и увеличением размера опухоли в пределах T1-3 темп речи снижался ($p = 0,026$). В третьей подгруппе пациентов с локализацией рака на боковой поверхности тела языка и распространением его на дно полости рта с увеличением размера опухоли в пределах T1-3 темп речи уменьшался ($p = 0,034$, *U*-критерий Kruskel–Wallis и Mann–Whitney).

Из рис. 2 видно, что у пациентов первой подгруппы контрольной группы после V-образной резекции передней трети языка с глоссопластикой статистических различий не наблюдалось ($p_{1\text{-}6} = 0,068$), но имела место тенденция к повышению темпа речи. У пациентов второй подгруппы после гемиглоссэктомии и у пациентов третьей подгруппы после гемиглоссэктомии с резекцией дна полости рта наблюдалось значимое улучшение темпа речи ($p_{1\text{-}6} < 0,001$, метод Friedman и критерий Wilcoxon). Применение методик внутриротовых резекций у пациентов первой–третьей подгрупп показало значимые различия между показателями

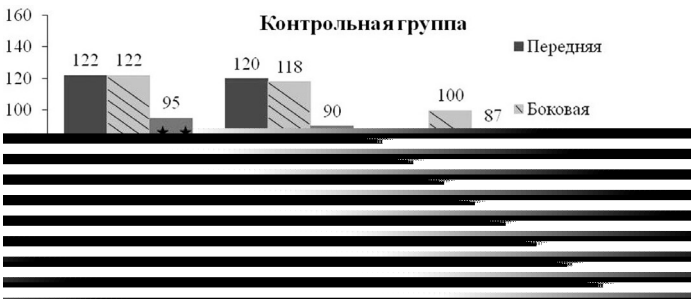


Рис. 1. Оценка темпа речи пациентов контрольной группы до операции в зависимости от локализации и размера опухоли

Fig. 1. Assessment of the speech rate in the patients of the control group before surgery depending on the tumor location and size

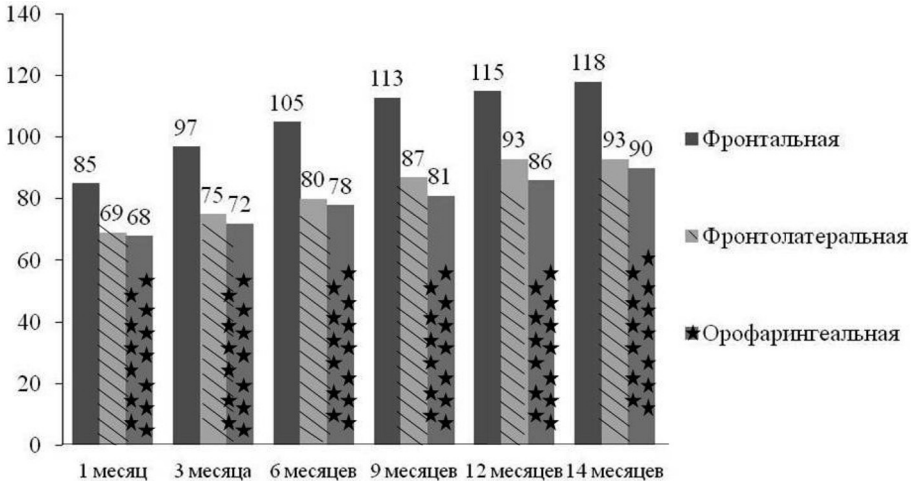


Рис. 4. Оценка темпа речи пациентов основной группы после расширенных резекций и пластики пострезекционного дефекта

Fig. 4. Assessment of the speech rate in the patients of the main group after extended resection and simultaneous plasty of post-resection defects

только жидкая диета;

только жидкость и мягкая пища, необходимость «смыва» мягкой пищи жидкостью;

жидкость, только мягкая пища, нет необходимости «смыва» мягкой пищи жидкостью;

жидкость, мягкая пища и механически мягкая пища – начало жевания;

все типы пищи, кроме твердой и волокнистой.

Из рис. 5, 6 видно, что в контрольной группе через 3 мес. после выполнения V-образной резекции передней трети языка с глоссопластикой 100 % пациентов стали принимать все типы пищи, а в основной группе после V-образной резекции передней трети языка с глоссопластикой и пластикой

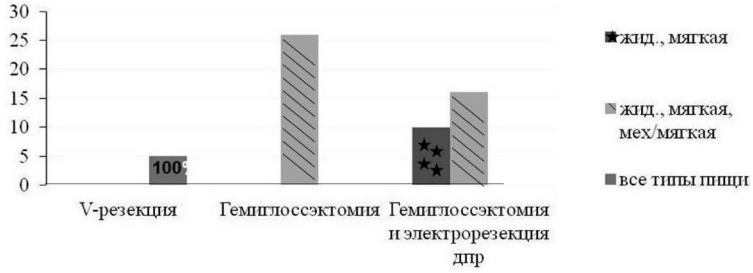


Рис. 5. Оценка глотания и тип питания пациентов контрольной группы через 3 мес. после внутриротовых резекций

Fig. 5. Assessment of swallowing and food types in the patients of the control group in 3 months after intraoral resection

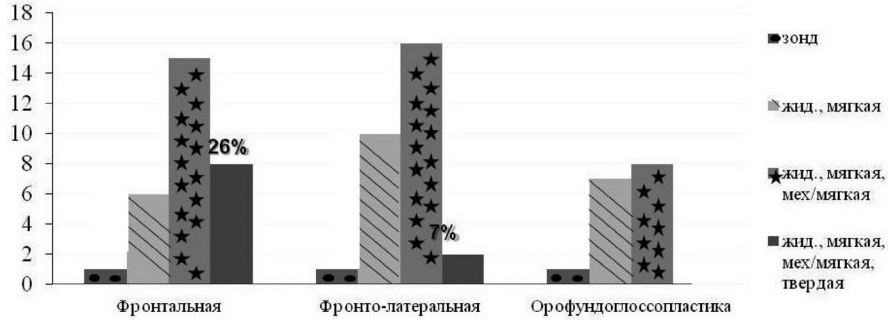


Рис. 6. Оценка глотания и тип питания пациентов основной группы через 3 мес. после расширенных резекций и этапа реконструктивных операций

Fig. 6. Assessment of swallowing and food types in the patients of the main group in 3 months after extended resections with reconstructive surgery

фронтального отдела собственно дна полости рта кожно-мышечным пекторальным лоскутом 26 % пациентов стали принимать жидкую, мягкую, механически мягкую и твердую пищу.

В контрольной группе после выполнения гемиглоссэктомии жидкую, мягкую и механически мягкую пищу стали принимать все пациенты. В основной группе после расширенной резекции в объеме гемиглоссэктомии и фронто-латеральной резекции дна полости рта с пластикой собственно дна полости рта кожно-мышечным пекторальным лоскутом на жидкую, мягкую, механически мягкую и твердую пищу перешли 7 % пациентов.

В контрольной группе после выполнения гемиглоссэктомии с электрорезекцией дна полости рта и в основной группе после расширенной резекции в объеме гемиглоссэктомии, резекции дна и боковых отделов полости рта, нижней челюсти, боковой и задней стенки ротоглотки статистически значимых различий по типу питания (жидкая, мягкая, механически мягкая) не наблюдалось ($p = 0{,}358$, χ^2-критерий Пирсона). Таким образом, все разработанные методики реконструктивных операций восстанавливают функцию глотания.

Заключение. Разработанные методики объемной пластики языка, пластики дна полости рта, боковой стенки ротоглотки позволяют восстановить анатомическую целостность и добиться приемлемого эффекта реконструкции в орофарингеальной области с учетом типа пострезекционного дефекта.

Оценка темпа речи пациентов контрольной группы показала, что при применении методик внутриротовых резекций имеются значимые улучшения ($p_{1\text{-}6} < 0{,}001$), особенно в первой подгруппе после V-образной резекции передней трети языка с глоссопластикой ($p = 0{,}068$). После расширенных резекций с разработанным нами реконструктивно-восстановительным этапом операции улучшение темпа речи отмечалось у пациентов всех подгрупп основной группы ($p < 0{,}05$).

Оценка акта глотания через 3 мес. показала, что в контрольной группе первой подгруппы все типы пищи принимают 100 % пациентов, в основной группе первой подгруппы – 26 %. В контрольной и основной группах во второй–третьей подгруппах различий по типу питания не наблюдалось ($p = 0{,}358$).

Список использованных источников

1. Джатин, П. Ша. Хирургия и онкология головы и шеи / П. Ша Джатин, Д. Пател Снеал, Сингх Буванеш; под ред. И. В. Решетова. – М.: Технология, 2016. – 838 с.

2. Океанов, А. Е. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь / А. Е. Океанов, П. И. Моисеев, Л. Ф. Левин; ред. О. Г. Суконко. – Минск, 2014. – 382 с.

3. Реконструктивные операции при опухолях головы и шеи / Р. И. Азизян [и др.]; под ред. Е. Г. Матякина. – М.: Вердана, 2009. – 222 с.

4. Пачес, А. И. Опухоли головы и шеи: клин. руководство / А. И. Пачес. – 5-е изд., доп. и перераб. – М.: Практ. медицина, 2013. – 478 с.

5. Аничкин, В. В. Метод внутриротовой V-образной резекции языка при раке с одномоментной глоссопластикой / В. В. Аничкин, В. В. Татчихин // Проблемы здоровья и экологии. – 2014. – № 3 (41). – С. 144–147.

6. Hammerlid, E. A prospective multicentre study in Sweden and Norway of mental distress and psychiatric morbidity in head and neck cancer patients / E. Hammerlid, M. Ahiner-Elmgvist, K. Bjordal // Br. J. Cancer. – 1999. – N 80. – P. 766–774.

7. Реконструктивно-восстановительные операции в медицинской реабилитации больных местно-распространенными и рецидивными злокачественными опухолями головы / И. В. Залуцкий [и др.] // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2002. – № 4. – С. 48–49.

8. Реконструктивная и пластическая хирургия в клинической онкологии / И. В. Залуцкий [и др.]. – Минск: Зорны верасень, 2007. – 252 с.

9. Vicente, J. C. Microvascular free tissue transfer for tongue reconstruction after hemiglossectomy: a functional assessment of radial forearm versus anterolateral thigh flap / J. C. Vicente, L. de Villalain, A. Torre // J. Oral Maxillofac Surg. – 2008. – N 66. – P. 2270–2275.

10. Rigby, Matthew H. Soft tissue reconstruction of the oral cavity: a review of current options / Matthew H. Rigby, Mark S. Taylor // Current Otolaryngology. Head and neck surgery. – 2013. – N 21. – P. 311–317 (in English).

11. Вихлянов, И. В. Реконструктивный этап хирургического лечения больных с опухолями орофарингеальной зоны / И. В. Вихлянов, Я. Н Шойхет, А. Ф. Лазарев // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2007. – Т. 18, № (1). – С. 32–35.

12. Способ резекции языка при хирургическом лечении рака передней трети тела языка: пат. 18424 Респ. Беларусь: МПК A61B 17/00 / В. В. Татчихин, В. В. Аничкин, И. В. Залуцкий, А. В. Макарчик; дата публ.: 28.02.2013 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2014. – № 4. – С. 65.

13. Способ пластики сквозного дефекта полости рта при хирургическом лечении рака языка и дна полости рта: пат. 19824 Респ. Беларусь: МПК A61B 17/00 / В. В. Татчихин, В. В. Аничкин, И. В. Залуцкий, А. В. Макарчик; дата публ.: 28.02.2016 // Афіцыйны бюл. / Нац. центр. інтэлектуал. уласнасці. – 2016. – № 1. – С. 70–71.

14. Способ реконструкции языка: пат. 20627 Респ. Беларусь: МПК 61B17/00 / В. В. Татчихин, В. В. Аничкин, И. В. Залуцкий, А. В. Макарчик; заявитель ГУ РНПЦ РМ и ЭЧ. – № a 20131156, заяв. 10.07.2013; уведомление о регистрации от 29.08.2016.

15. Романова, Н. Н. Культура речевого общения: этика, прагматика, психология: справ. изд-е / Н. Н. Романова, А. В. Филипов. – М.; Флинта: Наука, 2009. – 232 с.

16. Tongue reconstruction: Outcomes with the rectus abdominis flap // T. L. Andrew [et al.] // Plastic and Reconstractive Surgery. – 1999. – Vol. 103, N 2. – P. 442–447.

References

1. Dzhatin P. S., Sneal D. P. *Khirurgiya i onkologiya golovy i shei* [Surgery and oncology of head and neck], Reshetov I. V. (ed.), Technology, Moscow, RU, 2016.

2. Okeanov A. E., Moiseev P. I., Levin L. F. *Statistika onkologicheskikh zabolevanii v Respublike Belarus*' [Statistics of oncology diseases in the Republic of Belarus], Sukonko O. G. (ed.), Minsk, BY, 2014.

3. Azizyan R. I., Dobrokhotova V. Z., Kropotov M. A., Matyakin E. G. *Rekonstruktivnye operatsii pri opukholyakh golovy i shei* [Reconstructive operations at tumors of head and neck], Matiakin E. G. (ed.), Verdana, Moscow, RU, 2009.

4. Paches A. I. *Opukholi golovy i shei: klinicheskoe rukovodstvo* [Head and neck cancer: clinical practice guideline], Practical Medicine, Moscow, RU, 2013.

5. Anichkin V. V., Tatchikhin V. V. "Method of intramouth *V*-shaped resection of the tongue at cancer with one-moment glossoplasty", *Problems of Health and Ecology*, 2014, no. 3 (41), pp. 144–147.

6. Hammerlid E., Ahiner-Elmgvist M., Bjordal K. "Prospective multicentre study in Sweden, Norway of mental distress, psychiatric morbidity in head, neck cancer patients", *British Journal of Cancer*, 1999, no. 80, pp. 766–774.

7. Zalutskii I. V., Ovchinnikov D. V., Zhukovets A. G., Belotserkovskii I. V., Shan'ko Yu. G. "Reconstructive-reparative operations during medical rehabilitation of patients with local and recurrent head cancer", *Annals of Plastic, Reconstructive and Aethetic Surgery*, 2002, no. 4, pp. 48–49.

8. Zalutskii I. V., Fradkin S. Z., Yaskevich L. Ya. *Rekonstruktivnaya i plasticheskaya khirurgiya v klinicheskoi onkologii* [Reconstructive and plastic surgery in clinical oncology], Zorny verasen', Minsk, BY, 2007.

9. Vicente J. C., Villalain L. D., Torre A. I. "Microvascular free tissue transfer for tongue reconstruction after hemiglossectomy: a functional assessment of radial forearm versus anterolateral thigh flap", *Journal Oral, Maxillofacial Surgery*, 2008, no. 66, pp. 2270–2275.

10. Matthew H. R., Mark T. S. "Soft tissue reconstruction of the oral cavity: a review of current options", *Current Otolaryngology. Headandnecksurgery*, 2013, no. 21, pp. 311–317.

11. Vikhlyanov I. V., Shoikhet Ia. N., Lazarev A. F. "Reconstruction stage of operative therapy of patients with oropharingal zone tumors", *The Bulletin of Russian oncological scientific center named after N. N. Blochin RAMS* [Bulletin of the N. N. Blokhin Russian Oncological National Center of the Russian Academy of Medical Sciences], 2007, no. 18, pp. 32–35.

12. Anichkin V. V., Zalutskii I. V., Tatchikhin V. V., Makarchik A. V. Gosudarstvennoe uchrezhdenie "Respublikanskii nauchno-prakticheskii tsentr radiatsionnoi meditsiny i ekologii cheloveka", Uchrezhdenie obrazovaniya "Gomel'skii gosudarstvennyi meditsinskii universitet", *Sposob rezektsii yazyka pri khirurgicheskom lechenii raka perednei treti tela yazyka* [A method of tongue resection during the tumor removal of the front third of the tongue body], Baza patentov Belarusi, Pat. 18424, 2014.

13. Anichkin V. V., Zalutskii I. V., Tatchikhin V. V., Makarchik A. V. Gosudarstvennoe uchrezhdenie "Respublikanskii nauchno-prakticheskii tsentr radiatsionnoi meditsiny i ekologii cheloveka", Uchrezhdenie obrazovaniya "Gomel'skii gosudarstvennyi meditsinskii universitet", *Sposob plastiki skvoznogo defekta polosti rta pri khirurgicheskom lechenii raka yazyka i dna polosti rta* [A method of plastic repair of the mouth through defect during the operative therapy of tongue and mouth floor tumor], Baza patentov Belarusi, Pat. 19824, 2016.

14. Anichkin V. V., Zalutskii I. V., Tatchikhin V. V., Makarchik A. V. Gosudarstvennoe uchrezhdenie "Respublikanskii nauchno-prakticheskii tsentr radiatsionnoi meditsiny i ekologii cheloveka", *Sposob ustraneniya postrezektsionnykh defektov tela yazyka i bokovoi stenki rotovoi chasti glotki pri lechenii raka orofaringeal'noi oblasti* [Remedy post-resection defects of body language and the side wall of the oropharynx in the treatment of oropharyngeal cancer], Baza patentov Belarusi, Pat. 20627, 2016.

15. Romanova N. N., Filipov N. N. *Kul'tura rechevogo obshcheniya: etika, pragmatika, psikhologiya: spravochnoe izdanie* [Culture of verbal communication: ethics, pragmatics, psychology: reference edition], Nauka, Flinta, Moscow, RU, 2009.

16. Andrew T. L., Gregory R. D., Evans D., Perez M. A., Mark A. S. "Tongue reconstruction: outcomes with the rectus abdominis flap", *Plastic, Reconstructive Surgery*, 1999, vol. 103, no. 2, pp. 442–447.

Информация об авторах

Татчихин Владимир Валентинович – заведующий отделением. Гомельский областной клинический онкологический диспансер (ул. Циалковского, 119а, 246051, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: gokod@mail.gomel.by

Залуцкий Иосиф Викторович – чл.-кор., д-р мед. наук, профессор, директор Института физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: IZalutsky@gmail.com

Аничкин Владимир Владимирович – д-р мед. наук, профессор. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: science@gsmu.by

Для цитирования

Татчихин, В. В. Хирургическое лечение пациентов с плоскоклеточным раком орофарингеальной области / В. В. Татчихин, И. В. Залуцкий, В. В. Аничкин // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 21–28.

Information about the authors

Tatchihin Vladimir Valentinovich – Head of the Department. Gomel Regional Clinical Oncological Dispensary (119a, Tsialkovskogo Str., 246051, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: gokod@mail.gomel.by

Zalutskii Iosif Viktorovich – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Director of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus.). E-mail: IZalutsky@gmail.com

Anichkin Vladimir Vladimirovich – D. Sc. (Med.), Professor. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus.) E-mail: science@gsmu.by

For citation

Tatchikhin V. V., Zalutskii I. V., Anichkin V. V. “Surgical treatment of patients with squamous cell carcinoma oropharyngeal”. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 21–28.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 577.125.3

Поступила в редакцию 05.09.2016
Received 05.09.2016

С. Н. Кирко, В. А. Гуринович, Е. П. Лукиенко, А. Г. Мойсеёнок, В. У. Буко

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Республика Беларусь

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В РАЦИОН РАПСОВОГО И ПАЛЬМОВОГО МАСЕЛ

Состав и физико-химические свойства пальмового масла обусловливают его широкое применение в пищевой промышленности при производстве продуктов питания и в качестве замены гидрогенизированных ненасыщенных жиров растительного происхождения. Целью настоящей работы было оценить, как присутствие пальмового и рапсового масел в диете влияет на абсорбцию и накопление в печени основных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (ЖК), а также на уровень транс-ЖК. Экспериментальные животные (крысы, отдельно самцы и самки) были разделены на контрольную группу и группы крыс, получавших рапсовое и пальмовое масла в объеме 5 % от общего жирового содержимого диеты (30 % от суточного рациона). Самки еще одной группы получали увеличенную дозу пальмового масла (10 % от жирового рациона). Сравнительная оценка уровня холестерина в плазме крови показала достоверное его увеличение в группе крыс, у которых отмечалось большое содержание пальмового масла. Уровень триглицеридов был достоверно повышен у животных всех опытных групп. Спектр жирных кислот в печени дозозависимо отражал жирнокислотный состав диеты. При потреблении пальмового масла уменьшалось содержание транс-ЖК по сравнению с таковым в группе контроля и в группе животных, в рационе которых было рапсовое масло. В то же время снижение уровня незаменимой а-линоленовой кислоты являлось негативным эффектом пальмового масла.

Ключевые слова: пальмовое масло, рапсовое масло, транс-жирные кислоты, холестерин, печень.

S. N. Kirko, V. A. Gurinovich, E. P. Lukienko, A. G. Moiseenok, V. U. Buko

Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

COMPARISON OF THE LIVER FATTY ACIDS CONTENT IN RATS FED CANOLA AND PALM OIL REACH DIET

Due to its low costs and physical and chemical properties the palm oil is the major oil produced and used in food industry. We compare the influence of olive and palm oils on the plasma lipid profile and the liver fatty acids content of experimental animals (rats). Male and female rats were divided into the control Canola oil (CO) group and the Palm oil (PO) group where the control group had 30 % of fat from a daily calorie intake whereas the CO and PO groups substitute 5 % of fat of canola and palm oils. Additionally, one female group had 10 % of palm oil substitution of dietary fat (PO2 group). Consumption of these diets causes a significant increase in plasma triglycerides in all experimental groups compared to the control group, a total cholesterol increase in the PO2 group. The liver fatty acids profile dose-dependently reflects the diet content. Palm oil decreases the trans-fatty acids amount compared to the control and CO groups but also decreases the level of essential a-linolenic acid which is considered as the negative effect of palm oil.

Keywords: palm oil, canola oil, trans-fatty acids, cholesterol, liver.

Введение. В последние десятилетия пальмовое масло (ПМ) все более широко используется в пищевой промышленности в составе кондитерских, кулинарных, хлебопекарных жиров, маргаринов, спредов, а также как компонент детских питательных смесей. Причиной растущей популярности ПМ являются его ценовая конкурентоспособность и своеобразные физико-химические свойства.

Свойства фракционированного ПМ можно охарактеризовать температурой размягчения: обычное масло – 31–38 °С, олеиновое – 19–24, стеариновое – 44–56 °С. При температуре 20 °С содержание твердого жира составляет 20–27 %, а при 3–9 °С – 31–87 %. Указанные характеристики объясняют заинтересованность технологов пищевой промышленности в широком применении ПМ. Для пищевых технологий физико-химические свойства ПМ являются оптимальными в связи с его полутвердой консистенцией при комнатной температуре, приемлемыми цветовыми и органолептическими характеристиками, а также достаточно высоким содержанием антиоксидантных факторов (каротиноидов, токотриенолов, фитостеролов и др.).

Примерно 50 % жирных кислот (ЖК) в ПМ составляют насыщенные кислоты, однако главной особенностью этого масла является высокое содержание (примерно 87 %) мононенасыщенных (МНЖК) и полиненасыщенных (ПНЖК) кислот во втором стереоспецифическом положении (sn-2) триглицеридов. При этом значительное количество насыщенных ЖК (НЖК) связано в триглицеридах в положениях sn-1 и sn-3. Это обеспечивает быстрое всасывание ненасыщенных ЖК из sn-2 положения в тонком кишечнике и затрудняет поступление НЖК в кровоток [1], что приближает ПМ по биологическим свойствам к растительным маслам. В частности, преимущественное всасывание олеиновой кислоты из sn-2 положения при потреблении ПМ оказывает такой же позитивный эффект на липидный профиль крови, как и при потреблении оливкового масла [2].

Важным фактором, способствующим широкому распространению ПМ в питании является возможность его использования вместо жиров, содержащих транс-ЖК. Известно, что увеличение уровня транс-ЖК приводит к повышению уровня холестерина липопротеинов низкой плотности, снижению содержания холестерина липопротеинов высокой плотности и эндотелиальной дисфункции, а также к проявлению провоспалительного эффекта за счет повышения фактора некроза опухолей альфа, интерлейкина-6 и С-реактивного белка, что существенно увеличивает риск сердечно-сосудистых заболеваний [3]. Замещение гидрированных масел с высоким содержанием транс-ЖК на ПМ в рационах здоровых добровольцев приводило к нормализации вышеприведенных липидных показателей и маркеров воспаления [4].

Имеющая место дискуссия о безопасности ПМ, его фракций и модифицированных форм происходит на фоне давно устоявшихся канонов науки о питании и рекомендаций ВОЗ о рационализации жирнокислотного компонента пищевых рационов и диетических схем. Состоявшийся в Бельгии очередной Европейский симпозиум «Пальмовое масло и здоровье» (Palm Oil and Health) (2014) показал отсутствие явных негативных эффектов ПМ на здоровье человека. Было подчеркнуто, что ни одно из используемых растительных масел не является совершенным и ПМ в этом отношении не исключение. В связи с этим в настоящей работе нами проведено сравнение влияния ПМ и рапсового масла (РМ) на жирнокислотный состав печени экспериментальных животных. Как пищевой продукт РМ получило широкое распространение в мире после выведения сортов рапса, не содержащих в семенах эруковую кислоту. В Беларуси РМ пользуется высоким спросом у населения, а его потребление превышает 85 тыс. т в год [5]. РМ и ПМ сопоставимы по своей способности снижать риск сердечно-сосудистых заболеваний при замещении частично гидрированных жиров в рационе человека [6]. В то же время у субъектов с умеренной гиперлипидемией эффект ПМ на липопротеиновый профиль значительно менее выражен, чем эффект РМ, основными компонентами которого являются ненасыщенные ЖК [7].

Основным органом липидного обмена является печень. Ее жирнокислотный состав во многом отражает наличие и уровень жирных кислот в диете, особенно длинноцепочечных и ненасыщенных.

Цель настоящей работы – оценить, как присутствие пальмового и рапсового масел в диете влияет на абсорбцию и накопление в печени основных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, а также на уровень транс-жирных кислот.

Материалы и методы исследования. Полученный при контрольной закупке коммерческий образец ПМ (DENGKIL FACTORY, Selengor Daul Ehsan, Малайзия) был исследован в отделе технологий кондитерской и масложировой продукции РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию». Результаты испытаний показали, что температура плавления образца составляет 39,5 °С; кислотное число – 0,38 мг КОН/г, перекисное число – 1,45 ммоль активного кислорода/кг. Массовая доля ЖК составила: пальмитиновой (16:0) – 45,8 %, олеиновой (18:1) – 38,4, линолевой (18:2) – 9,4, стеариновой (18:0) – 4,4, миристиновой (14:0) – 1,0, арахиновой (20:0) – 0,4, лауриновой (12:0) – 0,2, пальмитолеиновой (16:1) – 0,2, линоленовой (18:3) – 0,2, бегеновой (22:0) – 0,1 %. Суммарное содержание триглицеридов составило 59,03 % (t = 10 °С) и 33,78 % (t = 20 °С), что соответствует данным по испытанию качества масла.

Исследование проводили на 22 крысах-самцах и 40 крысах-самках линии Wistar массой 80 г (начало эксперимента), содержавшихся в стандартных условиях вивария при постоянном досту-

пе к полноценному корму и питьевой воде. Животным опытных групп в течение месяца к кормовому рациону ежедневно добавляли дезодорированное рафинированное РМ или 5 % ПМ на 100 г корма (группа ПМ1). Группа ПМ2 была сформирована из крыс-самок, получавших 10 % ПМ на 100 г корма. При добавлении растительных масел руководствовались Санитарными нормами и правилами «Требования к питанию населения: нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения», утвержденными Постановлением МЗ РБ от 20.11.2012 № 180, Методическими рекомендациями МР 2.3.1.2432-08 и литературными данными. Содержание жиров для контрольной группы, а также для групп РМ и ПМ1 составляло 30 % от калорийности суточного рациона, в том числе для групп РМ и ПМ1 – 21 % (за счет добавления рапсового или пальмового масла), а для группы ПМ2 – 42 % (за счет добавляемого ПМ). Измерение в плазме крови крыс контрольной и опытных групп уровня холестерина, триглицеридов осуществляли ферментативным методом с помощью стандартных наборов «Анализ Мед» (Беларусь).

Определение содержания жирных кислот в печени крыс методом газожидкостной хроматографии. *Пробоподготовка.* Общие липиды из печени животных экстрагировали по методу Фолча [8], используя хлороформ-метанольную смесь в соотношении 2:1. Замороженную ткань гомогенизировали в хлороформ-метанольной смеси в стеклянном гомогенизаторе и оставляли при комнатной температуре минимум на 4 ч, постоянно перемешивая для экстракции липидов. После этого пробы пропускали через бумажные фильтры, а фильтрат упаривали на водяной бане в токе азота до белого осадка, который подвергали гидролизу и этерификации с помощью серной кислоты в метаноле [9] с образованием метиловых эфиров ЖК [10]. Полученные метиловые эфиры экстрагировали 3 раза гексаном по 3 мл. Экстракты объединяли и упаривали на водяной бане в токе азота до 1,5 мл, а затем исследовали методом газожидкостной хроматографии.

Анализ жирных кислот. Аликвоту 10 мкл вводили в прибор (Agilent, модель 6850 с автосамплером, США) с делителем потока 1:10, т. е. для анализа использовали 1 мкл экстракта. Колонка капиллярная DB-WAX – 30 м × 0,25 мм, толщина слоя – 0,25 мм (Agilent). Температурные условия следующие: колонка – от 40 до 260 °С со скоростью 6 °С/мин, инжектор – 260 °С, детектор – 300 °С. Время анализа – 56 мин. Газ-носитель – азот. Для расчета количественного (мг/г ткани) и процентного содержания ЖК (процент от суммы всех ЖК) использовали внутренний стандарт – гептадекановую кислоту, C17:0 (Sigma H3500), которую в дозе 0,5 мг добавляли в хлороформ-метанольный экстракт. Для качественной идентификации ЖК применяли стандарт фирмы Supelco (Supelco 37 component FAME Mix, Cat # 47885-U).

Результаты и их обсуждение. В ходе эксперимента не выявлено различий в приросте массы тела крыс в зависимости от вида и количества добавляемого масла, поскольку животные получали одинаковое количество калорий с кормом. Не установлено различий и в весе органов крыс контрольной и опытных групп.

При определении липидного профиля в плазме крови выявлено достоверное увеличение холестерина в группе ПМ2 и триглицеридов в опытных группах (табл. 1).

Исследование спектра ЖК в печени осуществляли методом газожидкостной хроматографии метиловых эфиров ЖК. При добавлении ПМ в рацион в количестве 5 % к 100 г корма в печени животных (самцы) выявлено достоверное повышенное содержание НЖК по сравнению с таковым в группе РМ (пальмитиновая – С16:0, стеариновая – С18:0), снижение МНЖК (пальмитолеиновая – С16:1n9, олеиновая – С18:1n9) и ПНЖК (линолевая – С18:2n6, альфа-линоленовая – С18:3n3, эйкозопентаеновая – 20:5n3) (табл. 2).

При добавлении ПМ в количестве 5 и 10 % к 100 г корма в печени животных (самки) обнаружено достоверное повышенное содержание НЖК (пальмитиновой) по сравнению с таковым в группе РМ, снижение МНЖК (пальмитолеиновой) у крыс группы ПМ2 и ПНЖК (альфа-линоленовой, эйкозопентаеновой) (табл. 3).

В табл. 4 приведен сравнительный анализ уровня основных ЖК в печени животных контрольной и опытных групп для определения их доли в общем жирнокислотном составе печени и в количественном содержании в зависимости от потребляемого количества масла. Как следует

Т а б л и ц а 1. **Содержание холестерина и триглицеридов в плазме крови крыс при введении в рацион животных растительных масел (M ± SEM)**

T a b l e 1. **Rat plasma cholesterol and triglycerides content in the presence of vegetable oils in the diet (M ± SEM)**

Группа	Холестерин, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л
Самцы		
Контроль	1,81 ± 0,30	0,59 ± 0,14
РМ	1,75 ± 0,34	0,82 ± 0,35*
ПМ1	2,08 ± 0,41	0,72 ± 0,27*
Самки		
Контроль	1,73 ± 0,50	0,51 ± 0,22
РМ	1,62 ± 0,29	0,52 ± 0,15
ПМ1	1,80 ± 0,36	0,70 ± 0,32
ПМ2	2,22 ± 0,23*#	0,75 ± 0,14*#

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий ($p < 0,05$): * – по отношению к контролю, # – по отношению к группе РМ.

Т а б л и ц а 2. **Содержание основных жирных кислот (мг/г ткани) в печени крыс-самцов контрольной и опытных групп (M ± SD)**

T a b l e 2. **Main fatty acids content (mg/g tissue) in the liver of rats (males) in the control and treatment groups (M ± SD)**

ЖК	Контроль	РМ	ПМ1
C14:0	0,151 ± 0,045	0,164 ± 0,036	0,123 ± 0,030#
C16:0	7,605 ± 1,214	5,813 ± 0,841*	7,858 ± 1,293#
C16:1n7	0,554 ± 0,191	0,212 ± 0,072*	0,196 ± 0,083*
C18:0	6,159 ± 0,753	5,429 ± 0,683*	6,749 ± 0,557#
C18:1n9	3,107 ± 0,862	4,819 ± 1,505*	3,830 ± 0,879
C18:2n6	4,412 ± 0,722	5,750 ± 1,253*	4,732 ± 0,638#
C18:3n6	0,095 ± 0,035	0,086 ± 0,013	0,077 ± 0,018
C18:3n3	0,100 ± 0,035	0,285 ± 0,080*	0,076 ± 0,024#
C20:4n6	6,337 ± 0,868	5,026 ± 0,785*	6,355 ± 0,547#
C20:5n3	0,076 ± 0,024	0,141 ± 0,045*	0,050 ± 0,012*#
C22:6n3	1,459 ± 0,223	1,191 ± 0,204*	1,385 ± 0,212

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий ($p < 0,05$): * – по отношению к контролю, # – по отношению к группе РМ.

Т а б л и ц а 3. **Содержание основных жирных кислот (мг/г ткани) в печени крыс-самок контрольной и опытных групп (M ± SD)**

T a b l e 3. **Main fatty acids content (mg/g tissue) in the liver of rats (females) in the control and treatment groups (M ± SD)**

ЖК	Контроль	РМ	ПМ1	ПМ2
C14:0	0,221 ± 0,133	0,131 ± 0,036*	0,221 ± 0,094#	0,171 ± 0,067
C16:0	7,646 ± 5,748	6,217 ± 1,458	9,825 ± 2,833#	10,747 ± 2,726#
C16:1n7	0,797 ± 0,515	0,213 ± 0,111*	0,582 ± 0,359#	0,300 ± 0,163*○
C18:0	7,082 ± 3,400	8,148 ± 1,330	8,191 ± 1,124	8,207 ± 0,572
C18:1n9	5,844 ± 6,247	5,008 ± 1,568	8,512 ± 3,254#	10,293 ± 4,149*#
C18:2n6	5,412 ± 3,426	6,350 ± 1,402	6,015 ± 1,55	6,152 ± 1,881
C18:3n6	0,107 ± 0,050	0,103 ± 0,029	0,085 ± 0,023	0,080 ± 0,022*
C18:3n3	0,194 ± 0,121	0,338 ± 0,162*	0,159 ± 0,059#○	0,114 ± 0,060*#○
C20:4n6	6,478 ± 2,715	6,752 ± 0,936	7,121 ± 1,220	6,913 ± 0,451
C20:5n3	0,110 ± 0,042	0,148 ± 0,031*	0,090 ± 0,023#	0,083 ± 0,050#
C22:6n3	1,569 ± 0,346	1,827 ± 0,326*	1,566 ± 0,290#	1,503 ± 0,177#

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий ($p < 0,05$): * – по отношению к контролю; # – по отношению к группе РМ, ○ – по отношению ПМ1 к ПМ2

из представленных результатов, удельный вес пальмитиновой, олеиновой и линоленовой кислот в условиях проведенного эксперимента не претерпел достоверных изменений. Однако в эксперименте на самках установлено дозазависимое увеличение уровня пальмитиновой кислоты в ткани печени при потреблении ПМ. Этот эффект практически не проявился у самцов, но представляется очевидным, что при потреблении РМ или ПМ тенденция изменения уровня пальмитата противоположная. Эта закономерность просматривается и в отношении уровня олеиновой кислоты, причем у самок нарастание ее уровня носит дозозависимый характер при потреблении ПМ. Отмечено достоверное уменьшение уровня транс-ЖК (табл. 5): элаидиновой (транс-олеиновой) и транс-пальмитолеиновой как у подопытных крыс-самок, так и крыс-самцов, потреблявших ПМ. При этом уменьшение содержания элаидиновой кислоты у крыс-самцов в группе ПМ1 по сравнению с аналогичным показателем в группе РМ наблюдается на фоне увеличения олеиновой кислоты и уменьшения пальмитиновой в группе РМ, тогда как у самок, наоборот, дозозависимое увеличение олеиновой и пальмитиновой кислот в группах ПМ1 и ПМ2 по сравнению с РМ показало достоверное уменьшение элаидиновой кислоты. При этом следует отметить, что по сравнению с контролем уровень транс-кислот либо достоверно ниже, либо имеет тенденцию к уменьшению в группах с ПМ, что говорит о том, что частичная замена жирового компонента корма на ПМ приводит к достоверному снижению транс-кислот как у самцов, так и у самок, а замена на РМ, наоборот, к увеличению содержания транс-кислот (палмитолеиновой). Это объясняется присутствием в рапсовом масле 0,2 % транс-жиров, в то время как в пальмовом масле их

Т а б л и ц а 4. **Уровень жирных кислот в печени крыс контрольной и опытных групп (M ± SD)**

T a b l e 4. **Rats liver fatty acids level in the control and treatment groups (M ± SD)**

Группа	C16:0 (пальмитиновая)		C18:1n9 (олеиновая)		C18:3n3 (линоленовая)	
	% от суммы ЖК	мг/г ткани	% от суммы ЖК	мг/г ткани	% от суммы ЖК	мг/г ткани
Самцы						
Контроль	21,98 ± 1,09	7,60 ± 1,21	8,84 ± 1,16	3,11 ± 0,86	0,28 ± 0,06	0,10 ± 0,04
РМ	17,65 ± 1,65	5,81 ± 0,84*	14,37 ± 2,99	4,82 ± 1,51*	0,85 ± 0,16	0,28 ± 0,08*
ПМ1	22,0 ± 1,93	7,86 ± 1,29$^{\#}$	10,67 ± 1,43	3,83 ± 0,88	0,21 ± 0,05	0,08 ± 0,02$^{\#}$
Самки						
Контроль	18,57 ± 2,41	8,45 ± 5,47	11,53 ± 4,66	4,04 ± 2,69	0,52 ± 0,29	0,19 ± 0,12
РМ	15,62 ± 1,09	6,22 ± 1,46	12,46 ± 1,51	5,01 ± 1,57	0,83 ± 0,31	0,34 ± 0,16*
ПМ1	20,72 ± 1,68	9,83 ± 2,83$^{\#}$	17,65 ± 3,54	8,51 ± 3,25$^{*\#}$	0,33 ± 0,09	0,16 ± 0,06$^{\#}$
ПМ2	21,40 ± 1,44	10,75 ± 2,73$^{\#}$	19,95 ± 3,93	10,29 ± 4,15$^{*\#}$	0,22 ± 0,11	0,11 ± 0,06$^{\#}$

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий ($p < 0,05$): * – по отношению к контролю, $^{\#}$ – по отношению к группе РМ.

Т а б л и ц а 5. **Содержание транс-жирных кислот (мг/г ткани) в печени крыс контрольной и опытных групп (M ± SD)**

T a b l e 5. **Trans-fatty acids content (mg/g tissue) in the liver of rats in control and treatment groups (M ± SD)**

Группа	C16:1n7 trans	C18:1n9 trans	C18:2n6 trans
Самцы			
Контроль	0,108 ± 0,057	0,963 ± 0,149	0,098 ± 0,061
РМ	0,196 ± 0,056*	0,846 ± 0,151	0,093 ± 0,025
ПМ1	0,084 ± 0,027$^{\#}$	0,615 ± 0,124$^{*\#}$	0,0770,026
Самки			
Контроль	0,133 ± 0,078	1,033 ± 0,323	0,222 ± 0,169
РМ	0,162 ± 0,046	0,833 ± 0,139*	0,131 ± 0,057*
ПМ1	0,141 ± 0,048	0,851 ± 0,220*	0,239 ± 0,154$^{\#}$
ПМ2	0,131 ± 0,049$^{\#}$	0,750 ± 0,127$^{*\#}$	0,204 ± 0,114$^{\#}$

Достоверность различий ($p < 0,05$): * – по отношению к контролю; $^{\#}$ – по отношению к группе РМ, $^{\circ}$ – по отношению ПМ1 к ПМ2.

нет. Отмечен низкий уровень линоленовой кислоты, относящейся к незаменимым ЖК, в печени животных, получавших ПМ, тогда как при потреблении РМ уровень этой кислоты значительно и достоверно возрастал. Это может быть расценено как неблагоприятный эффект ПМ (в котором линоленовой кислоты очень мало), поскольку линолевая кислота является незаменимым фактором питания и служит предшественником других биологически активных соединений жирнокислотного ряда (в частности, арахидоновой кислоты – представителя омега-6 ЖК), являющихся субстратами биосинтеза класса биорегуляторов – эйказоноидов.

В целом, анализ жирнокислотного состояния печени показал, что оно дозозависимо отражает состав диеты. Так, увеличение НЖК (пальмитиновой) и МНЖК (олеиновой) после потребления ПМ является отражением ее компонентного состава, тогда как РМ, содержащее преимущественно МНЖК (олеиновой – 28 %, эруковой – 33 %) и ПНЖК (линолевой – 14 %), не оказало существенного воздействия на уровень пальмитиновой и олеиновой кислот, но увеличило уровень линоленовой кислоты в 2,5–3 раза относительно контрольного уровня.

При сравнительно одинаковом содержании линолевой кислоты в РМ (14 %) и ПМ (10–11 %) установлено достоверное повышение ее уровня у крыс-самцов в группе РМ и тенденция к повышению ее содержания у самок опытных групп по сравнению с контролем.

В последние годы значительное внимание уделяется изучению влияния ПМ, содержащего большое количество НЖК, на риск развития патологий сердечно-сосудистой системы, а также заболеваний печени. Это обусловлено тем, что во всем мире ПМ используется в качестве заменителя жиров, являющихся источником транс-ЖК, в частности, молочных жиров, продуктов частичной гидрогенизации растительных жиров и др.

На сегодняшний день известно, что транс-жиры повышают риск сердечно-сосудистых заболеваний, отрицательно влияя на обмен холестерина и липопротеинов [11, 12], при этом риск развития этих заболеваний под влиянием транс-ЖК значительно выше, чем при потреблении НЖК [13]. Данные эпидемиологических наблюдений за период от 6 до 20 лет [14–18] у мужчин и женщин разного возраста показывают четкую зависимость между уровнем потребления транс-жиров и риском сердечно-сосудистых заболеваний. Недавнее исследование на 2742 пациентах в рамках программы «Сердечно-сосудистое здоровье» (Cardiovascular Health Study) показало, что уровень транс-ЖК в фосфолипидах плазмы с высокой степенью коррелирует с частотой ишемической болезни сердца и вызванной ею смертностью [19]. Помимо влияния на циркулирующие липиды, мишенями для повреждающего действия пищевых транс-ЖК являются различные типы клеток, включая гепатоциты, адипоциты, макрофаги и эндотелиальные клетки, что вызывает дисфункцию эндотелиальной системы, триггеров системного воспаления, способствует висцеральному ожирению, инсулиновой резистентности и повышению массы тела [20].

Результаты ряда исследований показали, что при сравнении биологических эффектов ПМ и других растительных масел (соевого, оливкового, рапсового), несмотря на то что ПМ повышает содержание холестерина крови, существенных различий в обмене липидов и липопротеинов не обнаружено [21]. Потребление ПМ приводит к менее благоприятным изменениям холестерина липопротеинов низкой плотности и аполипопротеина В у пациентов с умеренной гиперлипидемией, чем при потреблении РМ, однако различия между этими двумя группами по другим факторам риска, в частности по обмену липопротеинов высокой плотности и гомеостазу глюкозы, практически отсутствовали [7].

Заключение. Приведенные нами данные подтверждают снижение уровня транс-ЖК у крыс, получавших ПМ, по сравнению с аналогичным показателем как у животных контрольной группы, так и крыс, получавших РМ, что может быть одним из факторов, снижающим неблагоприятное влияние высокого содержания НЖК в ПМ. Кроме того, ПМ содержит значительное количество олеиновой кислоты, обусловливающей благотворные эффекты оливкового масла, а также компоненты, обладающие антиоксидантной активностью (токотриенолы, каротиноиды, фитостеролы), оказывающие положительное влияние на здоровье человека. Следует отметить, что в последних исследованиях все чаще пересматриваются отрицательные эффекты пищевых НЖК на здоровье человека и указывается, что в развитии гиперхолестеринемии играет роль не только

тип жира, но и структура триглицеридов [2]. При этом не следует сбрасывать со счетов и негативные последствия потребления ПМ, в частности снижение уровня незаменимых ЖК. Приведенные в настоящем исследовании результаты позволяют считать, что ПМ можно использовать в пищевой промышленности для замещения частично гидрированых жиров, одновременно восполняя жировой компонент рациона незаменимыми жирными кислотами.

Список использованных источников

1. May, C. Y. Research advancements in palm oil nutrition / C. Y. May, K. Nasaretman // Eur. J. Lip. Sci. Technol. – 2014. – Vol. 116, N 10. – P. 1301–1315.

2. Choudhury, N. Comparison of palmolein and olive oil: effects on plasma lipids and vitamin E in young adults / N. Choudhury, L. Tan, A. S. Truswell // Am. J. Clin. Nutr. – 1995. – Vol. 61, N 5. – P. 1043–1051.

3. Mozaffarian, D. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence / D. Mozaffarian, A. Aro, W. C. Willett // Eur. J. Clin. Nutr. – 2009. – Vol. 63, suppl. 2. – P. S5–S21.

4. Effects of partially hydrogenated, semi-saturated, and high oleate vegetable oils on inflammatory markers and lipids / K. T. Teng [et al.] // Lipids. – 2010. – Vol. 45, N 5. – P. 385–392.

5. Рапсовое масло по полезности близко к оливковому! // Комс. правда в Беларуси. – 2012. – 27 апр. – Available at: http://www.kp.by/daily/25875/2839228.

6. Mozaffarian, D. Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils / D. Mozaffarian, R. Clarke // Eur. J. Clin. Nutr. – 2009. – Vol. 63, suppl. 2. – P. S22–S33.

7. Palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects / V. López [et al.] // Am. J. Clin. Nut. – 2006. – Vol. 84, N 1. – P. 54–62.

8. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, N 1. – P. 497–509.

9. Evershed, R. P. Lipid analyses. A practical approach / R. P. Evershed. – Oxford, 1992. – 22 p.

10. Hitchcock, C. Developments in food analyses / C. Hitchcock, E. W. Hammond. – London, 1980. – 128 p.

11. Mensink, R. P. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects / R. P. Mensink, M. B. Katan // New Eng. J. Med. – 1990. – Vol. 323. – P. 439–444.

12. Effect of dietary cis and trans fatty acids on serum lipoprotein[a] levels in humans / R. P. Mensink [et al.] // J. Lip. Res. – 1992. – Vol. 33. – P. 1493–1501.

13. Dietary trans fatty acid: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women / J. T. Judd [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 1994. – Vol. 59. – P. 861–868.

14. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort followup study in the United States / A. Ascherio [et al.] // B. M. J. – 1996. – Vol. 313. – P. 84–90.

15. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women / F. B. Hu [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1997. – Vol. 337. – P. 1491–1499.

16. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The alphatocopherol, betacarotene cancer prevention study / P. Pietinen [et al.] // Am. J. Epidemiol. – 1997. – Vol. 145. – P. 876–887.

17. Association between trans fatty acid intake and 10year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective populationbased study / C. M. Oomen [et al.] // Lancet. – 2001. – Vol. 357. – P. 746–751.

18. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 years of followup of the Nurse's Health Study / K. Oh [et al.] // Am. J. Epidemiol. – 2005. – Vol. 161. – P. 672–679.

19. Plasma phospholipid trans-fatty acids levels, cardiovascular diseases, and total mortality: the cardiovascular health study / O. Wang [et al.] // J. Am. Heart. Assoc. – 2014. – Vol. 3. – P. e000914.

20. Micha, R. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes / R. Micha, D. Mozaffarian // Nat. Rev. Endocrinol. – 2009. – Vol. 5. – P. 335–344.

21. Медведев, О. С. Современные представления о возможном влиянии пальмового масла на здоровье человека / О. С. Медведев, Н. А. Медведева // Вопр. питания. – 2016. – Т. 85, № 1. – С. 5–18.

References

1. May C. Y., Nasaretman K. "Research advancements in palm oil nutrition", *European Journal of Lipid Science, Technology*, 2014, vol. 116, no. 10, pp. 1301–1315.

2. Choudhury N., Tan L., Truswel A. S. "Comparison of palmolein, olive oil: effects on plasma lipids, vitamin E in young adults", *American Journal of Clinical Nutrition*, 1995, vol. 61, no. 5, pp. 1043–1051.

3. Mozaffarian D., Aro A., Willett W. C. "Health effects of trans-fatty acids: experimental, observational evidence", *European Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol. 63, suppl. 2, pp. S5–S21.

4. Teng K. T., Voon T. P., Cheng M. H., Nesaretnam K. "Effects of partially hydrogenated, semi-saturated, high oleate vegetable oils on inflammatory markers, lipids", *Lipids*, 2010, vol. 45, no. 5, pp. 385–392.

5. "Rape oil in value close to olive oil!", *Komsomol'skaya pravda v Belarusi* [Komsomolskaya Pravda in Belarus], 2012, Available at: http://www.kp.by/daily/25875/2839228/, (Accessed 27 April 2012).

6. Mozaffarian D., Clarke R. "Quantitative effects on cardiovascular risk factors, coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats, oils", *European Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol. 63, suppl. 2, pp. S22–S33.

7. López V., Ausman L. M., Jalbert S. M., Erkkilä A. T., Lichtenstein A. H. "Palm, partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean, canola oils in moderately hyperlipidemic subjects", *American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, vol. 84, no. 1, pp. 54–62.

8. Folch J., Lees M., Sloane G. H. "A simple method for the isolation, purification of total lipides from animal tissues", *Journal of Biological Chemistry*, 1957, vol. 226, no. 1, pp. 497–509.

9. Evershed R. P. "Lipid analyses. A practical approach", Oxford, GB, 1992.

10. Hitchcock C., Hammond E. W. "Developments in food analyses", London, GB, 1980.

11. Mensink R. P., Katan M. B. "Effect of dietary trans fatty acids on high-density, low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects", *New England Journal of Medicine*, 1990, vol. 323, pp. 439–444.

12. Mensink R. P., Zock P. L., Katan M. B., Hornstra G. "Effect of dietary cis, trans fatty acids on serum lipoprotein[a] levels in humans", *Journal of Lipid Research*, 1992, vol. 33, pp. 1493–1501.

13. Judd J. T., Clevidence B. A., Muesing R. A., Wittes J., Sunkin M. E., Podczasy J. J. "Dietary trans fatty acid: effects on plasma lipids, lipoproteins of healthy men, women", *American Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol. 59, pp. 861–868.

14. Ascherio A., Rimm E. B., Giovannucci E. L., Spiegelman D., Stampfer M., Willett W. C. "Dietary fat, risk of coronary heart disease in men: cohort followup study in the United States", *British Medical Journal*, 1996, vol. 313, pp. 84–90.

15. Hu F. B., Stampfer M. J., Manson J. E., Rimm E., Colditz G. A., Rosner B. A., Hennekens C. H., Willett W. C. "Dietary fat intake, the risk of coronary heart disease in women", *New England Journal of Medicine*, 1997, vol. 337, pp. 1491–1499.

16. Pietinen P., Ascherio A., Korhonen P., Hartman A. M., Willett W. C., Albanes D., Virtamo J. "Intake of fatty acids, risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The alphatocopherol, betacarotene cancer prevention study", *American Journal of Epidemiology*, 1997, vol. 145, pp. 876–887.

17. Oomen C. M., Ocké M. C., Feskens E. J. M., van Erp-Baart M.-A. J., Kok F. J., Kromhout D. "Association between trans fatty acid intake, 10year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective populationbased study", *Lancet*, 2001, vol. 357, pp. 746–751.

18. Oh K., Hu F. B., Manson J. E., Stampfer M. J., Willett W. C. "Dietary fat intake, risk of coronary heart disease in women: 20 years of followup of the Nurse's Health Study", *American Journal of Epidemiology*, 2005, vol. 161, pp. 672–679.

19. Wang Q., Imamura F., Lemaitre R. N., Rimm E. B., Wang M., King I. B., Song X., Siscovick D., Mozaffarian D., "Plasma phospholipid trans-fatty acids levels, cardiovascular diseases,, total mortality: the cardiovascular health study", *Journal of the American Heart Association*, 2014, vol. 3, p. e000914.

20. Micha R., Mozaffarian D. "Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease, diabetes", *Nature Reviews Endocrinology*, 2009, vol. 5, pp. 335–344.

21. Medvedev O. S., Medvedeva N. A. "*Modern concepts of a possible influence of palm oil on the human health*", *Voprosy pitaniya* [Nutritional issues], 2016, vol. 85, no. 1, pp. 5–18.

Информация об авторах

Кирко Сергей Николаевич – науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: skirko2002@yahoo.com

Гуринович Валерий Александрович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: val@bioch.basnet.by

Лукиенко Елена Петровна – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: val@bioch.basnet.by

Мойсеёнок Андрей Георгиевич – чл.-кор., д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: andrey.moiseenok@tut.by

Буко Вячеслав Ульянович – д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом. **Институт биохимии биологически** активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vu.buko@tut.by

Information about the authors

Kirko Siarhei Nicolaevich – Researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK-50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: skirko2002@yahoo.com

Gurinovich Valery Alexandrovich – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK-50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: gva77@list.ru

Lukienko Elena Petrovna – Ph. D. (Med.), Senior researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK-50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: office@bioch.basnet

Moiseenok Andrey Georgievich – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Division. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK-50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: andrey.moiseenok@tut.by

Buko Vyacheslav Ul'yanovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK-50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vu.buko@tut.by

Для цитирования

Сравнительная оценка жирнокислотного состава печени крыс при включении в рацион рапсового и пальмового масел / С. Н. Кирко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 29–37.

For citation

Kirko S. N., Gurinovich V. A., Lukienko E. P., Moiseenok A. G., Buko V. U. "Comparison of liver fatty acids content in rats fed canola and palm oil reach diet". *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 29–37.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616-006.3.04-053.2-08 (091)(476)

Поступила в редакцию 18.04.2016
Received 18.04.2016

Л. П. Киселёв, О. В. Алейникова

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Республика Беларусь

ПРИМИТИВНАЯ НЕЙРОЭКТОДЕРМАЛЬНАЯ ОПУХОЛЬ КОСТЕЙ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ У ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ: КЛИНИЧЕСКИЕ ИСХОДЫ И ПОКАЗАТЕЛИ ВЫЖИВАЕМОСТИ ЗА 15-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД

Оценены клинико-патологические характеристики и долгосрочные показатели выживаемости пациентов с примитивной периферической нейроэктодермальной опухолью (пПНЭО) костей и мягких тканей. В анализ включены 53 пациента с пПНЭО, получавших лечение с 1999 по 2014 г. Общая выживаемость для всей когорты пациентов составила 60,2 %, при локализованных и метастатических формах – 70,3 и 20,0 % соответственно. Не выявлено значимых отличий в характеристиках пациентов (пол, возраст, уровень лактатдегидрогеназы, размер и локализация опухоли и др.), позволяющих прогнозировать исход заболевания перед началом терапии.

Показатели долгосрочной выживаемости пациентов детского возраста с пПНЭО костей и мягких тканей в Республике Беларусь соответствует стандартам стран с развитой структурой здравоохранения. Молекулярные маркеры, характеризующие биологию новообразования, необходимы для прогнозирования исхода заболевания у пациентов, опухоль которых может быть резистентной к современным схемам лечения.

Ключевые слова: периферическая нейроэктодермальная опухоль костей и мягких тканей у детей, лечение, выживаемость.

L. Kisialeu, O. Aleinikova

Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Republic of Belarus

CLINICAL OUTCOMES AND SURVIVAL RATES OVER THE 15-YEAR PERIOD IN PEDIATRIC PATIENTS WITH PERIPHERAL PRIMITIVE NEUROECTODERMAL TUMOR OF BONE AND SOFT TISSUES IN REPUBLIC OF BELARUS

Peripheral primitive neuroectodermal tumor (pPNET) can occur in any bone or soft tissue and is about a quarter of all pediatric patients with Ewing's sarcoma family of tumors. The aim of this study was to investigate whether patient characteristics differ between the cases with favorable and unfavorable outcomes. Thus, 53 pediatric patients with pPNET from the Republic of Belarus reported to the sub-cancer registry database from 1999 to 2014 were evaluated. The survival rate was estimated by means of the Kaplan-Meier method and was compared using log-rank tests and Cox proportional hazard models. Overall survival (OS) was superior for localized pPNET compared with metastatic forms (70.3 % vs 20.0 %; $P = 0.0016$). Fifteen-year OS for the entire cohort of patients was 60.2 %. Known clinical prognostic factors (age, sex, tumors volume, response to treatment and other) did not differ between patients with favorable and unfavorable outcomes.

Treatment results for pediatric patients with pPNET from the Republic of Belarus comply with the generally accepted standards. Patients with metastatic status need new treatment strategies. Search for new predictive markers is required for early detection of resistant to conventional treatment patients with localized pPNET.

Keywords: peripheral primitive neuroectodermal tumor, pediatric patients, treatment, survival.

Введение. Примитивная периферическая нейроэктодермальная опухоль (пПНЭО) может возникать в костях или мягких тканях любой локализации у 1/4–1/3 всех пациентов детского возраста с опухолями семейства саркомы Юинга (СЮ) [1, 2]. Использование канцер-регистров с целью регистрации первичных пациентов, стадирования онкологического процесса и послелечебного наблюдения является современным стандартом для систематизации результатов терапии [2–4]. Отличие пПНЭО от классической СЮ основывается на наличии маркеров нейрональной дифференцировки: нейрон-специфической енолазы, CD57, синаптофизина, а также протеинов нейрофиломента и S100 [5, 6]. Ранее пПНЭО рассматривалась как отдельная нозология и лечилась по схемам, разработанным для мягкотканной патологии. Позднее обнаруженные генетиче-

© Киселёв Л. П., Алейникова О. В., 2017

ские поломки, идентичные с классической СЮ, дали основание объединить эти нозологии в одну группу и использовать протоколы костной СЮ. Известно, что применение только локального контроля (хирургического и/или лучевого методов) позволяло вылечить только 10–15 % пациентов, в остальных случаях возникал системный рецидив заболевания [6, 7]. Использование полихимиотерапии значительно улучшило отдаленные результаты лечения – до 60–65 % для локализованных (неметастатических) форм заболевания за последние десятилетия. Однако эти достижения не привели к увеличению количества положительных исходов у пациентов с наличием метастазов на момент постановки диагноза; показатели выживаемости у них не превышали 20–25 %, несмотря на применение различных вариантов высокоинтенсивных химиотерапевтических режимов [7, 8]. Помимо наличия метастазов в большинстве литературных источников представлены другие клинические маркеры неблагоприятного прогноза. Так, большой размер новообразования, недостаточная степень некроза опухоли после индукционной химиотерапии, центральная локализация новообразования, более старший возраст пациента могут ассоциироваться с худшим исходом заболевания. Однако, по мнению многих авторов, широкая вариабельность перечисленных критериев зачастую затрудняет их практическое использование в клинической практике в качестве прогностических маркеров, что подразумевает актуальность исследований в данном направлении [6–8]. За 15-летний период в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦДОГИ) Республики Беларусь осуществлено системное лечение 53 пациентов с пПНЭО костей и мягких тканей.

Цель исследования – оценка показателей долгосрочной выживаемости и анализ клинико-патологических характеристик пациентов детского возраста с благоприятными и неблагоприятными исходами терапии при примитивной периферической нейроэктодермальной опухоли костей и мягких тканей.

Материалы и методы исследования. Использованы данные Детского субканцер-регистра, в котором с 1999 по 2014 г. зарегистрированы 53 пациента с опухолью Аскина грудной стенки, мягкотканной СЮ или пПНЭО, диагностированными в РНПЦДОГИ – единственном учреждении в РБ для лечения детей и подростков до 18-летнего возраста [9]. Для постановки диагноза использовали гистологический, иммуногистохимический и молекулярно-биологический методы. У пациентов осуществлялся локальный контроль (операция при опухолях конечностей с заместительным эндопротезированием, операция + лучевая терапия, только лучевая терапия) и проводилось программное системное лечение. Для системной химиотерапии использовали 5 режимов. При режиме А химиотерапию осуществляли по протоколу мягкотканных опухолей рабдоидного генеза, применяя винкристин, доксорубицин, алкилирующие агенты, этопозид, препараты платины [10]. Режим В базировался на рекомендациях Европейского общества онкологов после 1992 г.: использовали винкристин, доксорубицин, дактиномицин, этопозид, а также алкилирующие агенты ифосфамид и циклофосфамид в режиме рандомизации [11]. Индукционная схема режима С соответствовала рекомендациям американских детских онкологов для костной СЮ и подразумевала проведение в альтернирующем режиме блоков винкристин/доксорубицин/циклофосфамид и этопозид/ифосфамид [12]. Консолидирующую терапию режима С проводили посредством высоких доз бусульфана и мелфалана с поддержкой периферической стволовой клеткой [13]. Режим D базировался на рекомендациях Европейского общества онкологов после 1999 г.: индукционные блоки были четырехкомпонентными (винкристин, доксорубицин, ифосфамид и этопозид), консолидирующая терапия – трехкомпонентной (винкристин, ифосфамид, актиномицин Д) [14]. У селективных пациентов режима Е наряду с четырехкомпонентной индукцией и трехкомпонентной консолидацией применяли блокаду ангиогенеза препаратом бевацизумаб на основании уровней маркеров ангиогенеза в ткани опухоли перед системной терапией.

После окончания лечения пациенты наблюдались Детским субканцер-регистром Республики Беларусь с постоянным обновлением статуса. Длительность бессобытийной выживаемости (БСВ), общей выживаемости (ОВ) и кумулятивной частоты рецидива (КЧР) исчислялась от времени постановки инициального диагноза.

Статистический анализ данных проводили с использованием программы R-statistics версии 3.2.0 (R Foundation for Statistical Computing, лицензия GNU GPL). Статистическую значимость различий между сравниваемыми количественными показателями оценивали с помощью *U*-теста

Манна–Уитни, сравнение в группах по индивидуальным параметрам – с помощью χ^2-теста. Кривые ОВ и БСВ выстраивали по методу Каплана–Мейера (Kaplan–Meier), для сравнительной оценки достоверности различий использовали логранговый критерий (log-rank test). Кумулятивную частоту возникновения событий рассчитывали методом конкурирующих рисков, различия кумулятивных частот – с использованием теста Gray. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки менее 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. У 3 (5,6 %) из 53 пациентов (2 – с локализованными формами, 1 – с метастатической) констатирована смерть от инфекционных осложнений без признаков наличия рецидива. Повторно вышли в ремиссию после терапии второй линии и живы на момент анализа 5 (33,3 %) из 15 пациентов с рецидивами (все с локализованными формами).

Учитывая, что наличие метастатического поражения на момент постановки диагноза является наиболее значимым фактором прогноза, клинико-патологические характеристики пациентов с локализованными и метастатическими формами оценивали отдельно.

Клинико-патологические характеристики пациентов с локализованными формами пПНЭО представлены в табл. 1. Пациенты были разделены на две группы на основании наличия или от-

Т а б л и ц а 1. **Клинико-патологические характеристики пациентов с локализованными формами пПНЭО костей и мягких тканей**

T a b l e 1. **Clinical and pathological characteristics of patients with localized pPNEO of bone and soft tissue**

Характеристика	Пациенты с рецидивом (n = 15)		Пациенты без рецидива (n = 26)		p
	n	%	n	%	
Пол:					
мужской	8	53,4	11	42,3	0,4952
женский	7	46,6	15	57,7	
Возраст, лет:					
≤14	8	53,4	14	53,8	0,9747
>14	7	46,6	12	46,2	
ЛДГ, ед/мл медиана (мин.–макс.)	427 (242–556)	–	457 (216–720)	–	0,3423
Анатомическая локализация:					
бедро	1	6,6	3	11,5	0,6126
ребро	8	53,8	13	50,0	0,8370
череп	3	19,8	2	7,7	0,2460
позвонки	3	19,8	6	23,1	0,8187
таз	0	0	2	7,7	0,2707
Размер опухоли, см медиана (мин.–макс.)	9,1 (2,3–13,0)	–	8,0 (2,0–22,0)	–	0,9697
Объем опухоли, мл медиана (мин.–макс.)	112,0 (22,0–715,0)	–	116,2 (12,0–1124,0)	–	0,4547
Операция:					
широкая резекция	6	40,0	10	38,5	0,9225
частичная резекция	4	26,6	7	26,9	0,9857
не выполнялась	5	33,4	9	34,6	0,9335
Локальный контроль:					
только операция	4	28,6	11	42,3	0,3166
операция и облучение	6	42,8	7	26,9	0,3861
только облучение	4	28,6	8	30,8	0,7809
Гистологический ответ:					
некроз ≥90 %	2	28,6	10	76,9	0,0885
некроз <90 %	5	71,4	3	23,1	0,0898
Режим химиотерапии:					
A*	7	47,2	7	27,8	0,1991
B	0	0	1	3,8	0,4419
C	1	6,6	3	11,4	0,6126
D	3	19,8	5	19,0	0,5820
E	4	26,4	10	38,0	0,4430

*Описание режимов химиотерапии представлено в разделе *Материалы и методы исследования.*

сутствия рецидива/продолженного роста заболевания. Как видно из данных, представленных в табл. 1, мужской пол несколько преобладал в группе рецидивов (53,4 % vs 42,3 %), однако относительное количество пациентов старшей возрастной группы было практически идентичным (53,4 % vs 53,8 %). Уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также размеры опухолевого очага варьировались в широких диапазонах. Более того, у пациентов с благоприятным исходом медианные значения уровня ЛДГ и объема первичного опухолевого очага были несколько выше, чем в группе рецидивов (разница статистически не значима). В обеих группах наиболее часто (50 %) очаг опухоли локализовался в ребрах, вторыми по частоте встречаемости оказались позвонки. Тазовая локализация обычно расценивается как неблагоприятная, но, по результатам нашего исследования, у обоих пациентов с наличием опухоли в этой области отмечалась длительная ремиссия. Не констатировано значимых различий в проценте широких резекций, так же как и в относительном количестве пациентов, которым выполнено хирургическое вмешательство. Отмечен больший удельный вес случаев использования протоколов для мягкотканых рабдоидных опухолей в группе с неблагоприятными исходами заболевания, а кроме того, у пациентов этой группы констатировано меньшее количество выраженного патоморфоза опухоли (≥90 %).

В группе с метастатическими формами пПНЭО у 7 (77,8 %) из 9 пациентов произошел рецидив и только в 2 случаях констатирована ремиссия. Клинико-патологические характеристики пациентов с метастатическими формами экстраоссальной СЮ представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. **Клинико-патологические характеристики пациентов с метастатическими формами пПНЭО костей и мягких тканей**

T a b l e 2. **Clinical and pathological characteristics of patients with metastatic pPNEO of bone and soft tissue**

Характеристика	Пациенты с рецидивом (n = 7)		Пациенты без рецидива (n = 2)		p
	n	%	n	%	
Пол:					
мужской	3	42,9	1	50	0,8577
женский	4	67,1	1	50	
Возраст, лет:					
≤14	4	67,1	1	50	0,8577
>14	3	42,9	1	50	
Анатомическая локализация:					
бедро	3	42,8	–	0	0,2568
ребро	2	28,6	1	0	0,3914
позвонки	2	28,6	1	50,0	0,5707
таз	0	0		50,0	0,0472
Операция:					
широкая резекция	2	28,6	0	0	0,3914
частичная резекция	0	0	1	50,0	0,0472
не выполнялась	5	71,4	1	50,0	0,5708
Локальный контроль:					
только операция	1	16,6	0	0	0,5708
операция и облучение	1	16,6	1	50,0	0,2840
только облучение	4	66,8	1	50,0	0,8577
Гистологический ответ:					
некроз ≥90 %	2	100,0	1	100,0	0,5708
некроз <90 %	0	0	0	0	
МТС изолировано в легкие	4	67,1	1	50,0	0,8577
Другие	3	42,9	1	50,0	
Режим химиотерапии:					
A*	3	42,9	1	50	
B	0	0	0	0	
C	4	67,1	1	50	0,8577
D	0	0	0	0	
E	0	0	0	0	

*Описание режимов химиотерапии представлено в разделе *Материалы и методы исследования*.

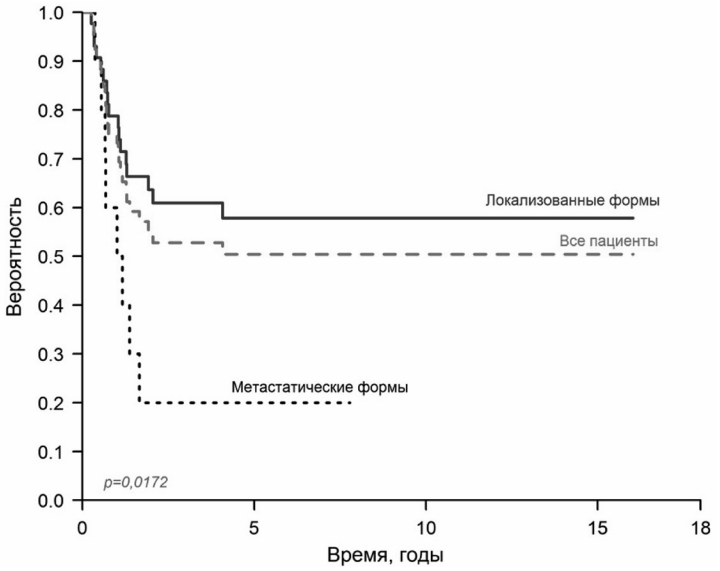


Рис. 1. Бессобытийная выживаемость пациентов в зависимости от распространенности процесса: локализованные формы (n = 43) – 26 без события [57,9 ± 7,9 %], все пациенты (n = 53) – 28 без события [50,4 ± 7,1 %]; метастатические формы (n = 10) – 2 без события [20,0 ± 12,7 %]

Fig. 1. The event-free survival for patients with pPNET depending on the spread of process: localized forms (n = 43) – 26 without event [57.9 ± 7.9 %]; all patients (n = 53) – 28 without event [50.4 ± 7.1 %]; metastatic forms (n = 10) – 2 without event [20.0 ± 12.7 %]

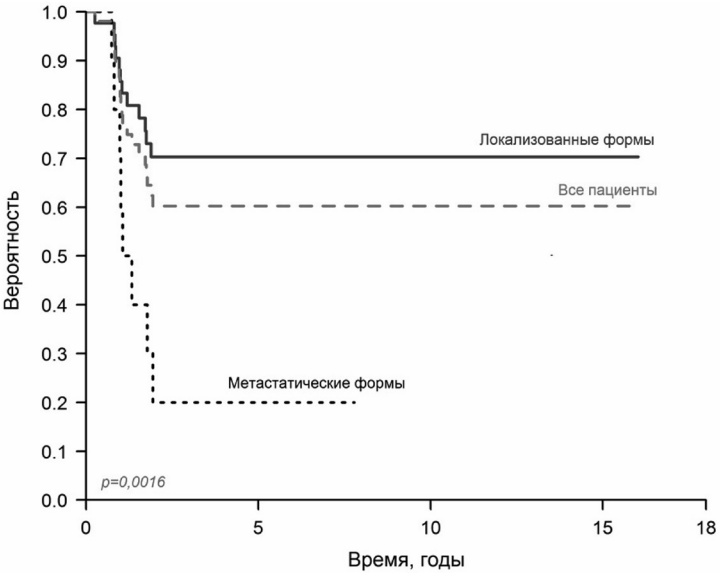


Рис. 2. Общая выживаемость пациентов в зависимости от распространенности процесса: локализованные формы (n = 43) – 31 живы [70,3 ± 7,2 %], все пациенты (n = 53) – 33 живы [60,2 ± 7,0 %]; метастатические формы (n = 10) – 2 живы [20,0 ± 12,7 %]

Fig. 2. The overall survival for patients with pPNET depending on the spread of process: localized forms (n = 43) – 31 alive [70.3 ± 7.2 %]; all patients (n = 53) – 33 alive [60.2 ± 7.0 %]; metastatic forms (n = 10) – 2 alive [20.0 ± 12.7 %]

Следует отметить, что среди выживших пациентов 1 – с изолированными метастазами только в легкие, 1 – с мультисистемным распространением, а кроме того, в обоих случаях с благоприятными исходами имела место не периферическая, а центральная локализация первичного опухолевого очага (таз и позвоночник).

Протокол мягкотканных сарком был эффективен у 1 (25 %) из 4 пациентов с метастатическим распространением онкологического процесса.

Нами оценены показатели БСВ, ОВ и КЧР за 15-летний период наблюдения как для всей когорты пациентов с пПНЭО костей и мягких тканей, так и отдельно для метастатических и локализованных форм заболевания.

Как представлено на рис. 1, БСВ для всей когорты пациентов с пПНЭО составила 50,4 %, для лиц с метастатическими и локализованными формами – 20,0 и 57,9 % соответственно.

Для всей когорты пациентов ОВ составила 60,2 % (рис. 2), для лиц с метастатическими и локализованными формами – 20,0 и 70,3 % соответственно.

КЧР (рис. 3) для всей когорты пациентов составила 43,8 %, для лиц с метастатическими и локализованными формами – 70,0 и 37,4 % соответственно.

Таким образом, в настоящем исследовании представлены результаты лечения за 15-летний период наблюдения и осуществлен анализ клинико-патологических характеристик пациентов с благоприятными и неблагоприятными исходами заболевания.

При оценке групп пациентов с рецидивом заболевания и находящихся в ремиссии констатирована их сопоставимость как в использовании терапевтических подходов (локальный контроль и системная терапия), так и в клинических показателях (пол, возраст, локализация первичного опухолевого очага). Наличие метастатического поражения остается неоспоримым фактором плохого клинического исхода заболевания. Что касается локализованных форм, то такие параметры, как уровень ЛДГ

и размеры новообразования, характеризуются значительным диапазоном и не могут однозначно характеризовать ту или иную сравниваемую когорту. Отмечено большее количество случаев выраженного опухолевого патоморфоза в группе пациентов, находящихся в ремиссии по основному заболеванию. Этот факт является логичным, но необходимо учитывать, что характер ответа новообразования на проведенное системное лечение становится известным только после нескольких месяцев (курсов) химиотерапии и не позволяет адекватно воздействовать на опухоль непосредственно после постановки диагноза. Комиссия по изучению биомаркеров Детской Онкологической Группы (COG, Children's Oncology Group) Национального Института Здоровья США свидетельствует, что на сегодняшний день отсутствует четкое понимание того, какие локализованные формы СЮ не ответят на лечение и для каких метастатических форм терапия может оказаться эффективной [7]. Таким образом, новые подходы, подразумевающие изучение биологии опухоли посредством молекулярных маркеров, необходимы для стратификации пациентов перед системным лечением на группы неудовлетворительного и положительного исходов заболевания.

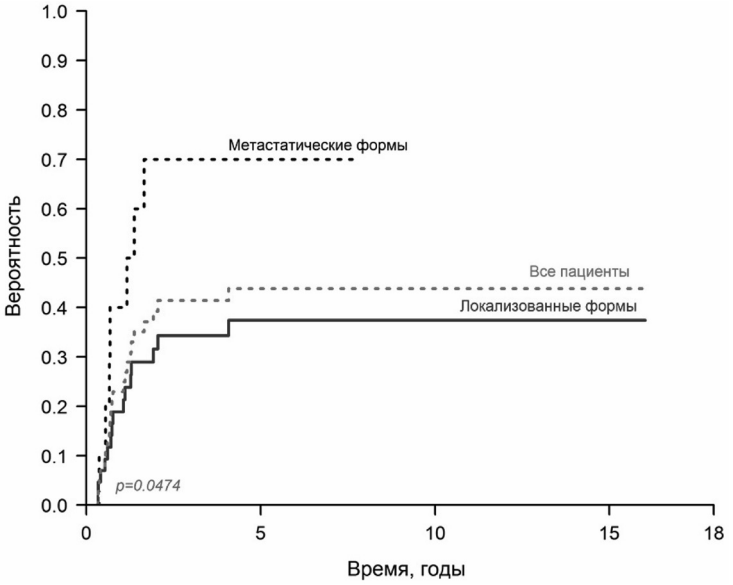


Рис. 3. Кумулятивная частота развития рецидивов у пациентов в зависимости от распространенности процесса: локализованные формы (n = 43) – 15 рецидивов [37,4 ± 7,9 %], все пациенты (n = 53) – 22 рецидива [43,8 ± 7,2 %]; метастатические формы (n = 10) – 7 рецидивов [70,0 ± 10,4 %]

Fig. 3. Cumulative incidence of recurrence for patients with pPNET depending on the spread of process: localized forms (n = 43) – 15 relapsed [37.4 ± 7.9 %]; all patients (n = 53) – 22 relapsed [43.8 ± 7.2 %]; metastatic forms (n = 10) – 7 relapsed [70.0 ± 10.4 %]

Анализ результатов лечения терапевтических протоколов мягкотканных опухолей IRS-I, IRS-II и IRS-III (Intergroup Rhabdomyosarcoma Study) показал, что 10-летняя выживаемость для локализованных форм пПНЭО составляет от 62 до 65 % [8, 15]. При объединенной оценке клинических исходов 683 пациентов с пПНЭО костей и мягких тканей, лечившихся по протоколам классической СЮ, констатирована 69 %-ная выживаемость для локализованных форм [6]. По результатам объединенного анализа, основанного на данных регистров США (SEER, Surveillance, Epidemiology, and End Results, 2014) и Европы (ACCIS, Automated Childhood Cancer Information System, 2007), более половины всех диагностированных пациентов с пПНЭО костей и мягких тканей, включая первично-метастатические формы, выживают [5, 7].

Анализ долгосрочных показателей выживаемости пациентов Республики Беларусь показал, что уровень БСВ и ОВ как в общей когорте пациентов с пПНЭО костей и мягких тканей (50,4 и 60,2 %), так и при локализованных формах, оцененных отдельно (57,9 и 70,3 %), сопоставим со стандартами стран с развитой системой здравоохранения. Необходимо учитывать, что централизация диагностических и лечебных мероприятий в одном высокоспециализированном учреждении республики позволяет увеличить вероятность благоприятных исходов для всех педиатрических пациентов с данной онкопатологией.

Заключение. Долгосрочные показатели выживаемости педиатрических пациентов с пПНЭО костей и мягких тканей в Республике Беларусь соответствуют стандартам стран с развитой системой здравоохранения. Актуальной задачей является раннее прогнозирование исхода заболевания с помощью молекулярных маркеров. Поиск новых направлений в лечении необходим для трети локализованных и большинства метастатических форм опухоли.

Список использованных источников

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. Declining childhood and adolescent cancer mortality / M. A. Smith [et al.] // Cancer. – 2014. – N 120. – P. 2497–2506.

6. Clinical features and outcomes in patients with extraskeletal Ewing sarcoma / M. A. Applebaum [et al.] // Cancer. – 2011. – Vol. 117 (13). – P. 3027–3032.

7. Up-to-date monitoring of childhood cancer long-term survival in Europe: tumours of the sympathetic nervous system, retinoblastoma, renal and bone tumours, and soft tissue sarcomas / V. Arndt [et al.] // Ann. Oncol. – 2007. – N 18. – P. 1722–1733.

8. Ewing's sarcoma of soft tissues in childhood: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study, 1972 to 1991 / R. B. Raney [et al.] // J. Clin. Oncol. – 1997. – Vol. 15 (2). – P. 574–582.

9. Петрович, С. Эпидемиологические аспекты детской онкогематологической заболеваемости в Республике Беларусь / С. Петрович, О. Алейникова, Т. Шумихина // Вопр. онкол. – 2002. – Т. 48 (3). – С. 301–305.

10. Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V / R. B. Raney [et al.] // J. Pediatr. Hematol. Oncol. – N 23. – P. 215–220.

11. Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment-cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients / M. Paulussen [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2008. – N 26. – P. 4385–4393.

12. Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumours: a Children's Oncology Group Study / L. Granowetter [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2009. – N 27. – P. 2536–2541.

13. Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumours: a study by the Societe Francaise des Cancers de l'Enfant / O. Oberlin [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2006. – N 24. – P. 3997–4002.

14. Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumours in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial / C. Juergens [et al.] // Pediatr. Blood Cancer. – 2006. – N 47. – P. 22–29.

15. Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials. Summary of a National Institutes of Health Workshop / V. G. de Gruttola [et al.] // Control. Clin. Trials. – 2001. – N 2. – P. 485–502.

References

1. Aleinikova O. V., Potapnev M. P., Sytskevich O. N., Petrovich S. V., Ismail-Zadeh R. S., Strongin Yu. C. "Advances in child oncology and hematology in the Republic of Belarus", *Aktual'nye voprosy detskoi onkologii i gematologii: materialy VIII mezhdunarodnogo simpoziuma, 27–29 aprelya 2000 g., g.Minsk* [Urgent Problems of Child Oncology and Hematology: Materials VIII Intern. Symp., April 27–29, 2000, Minsk], BelTsNMI, Minsk, BY, 2000, pp. 3–8.

2. Sukonko O. G., Antonenkova N. A. "Organizational, methodological assistance provided by the state institution "Republican Scientific-Practical Center of Oncology, Medical Radiology named after N. N. Alexandrov" healthcare organizations in the Republic of Belarus", *Onkologicheskii zhurnal* [Oncological Journal], 2011, no. 20, pp. 42–45.

3. Demidchik Yu. E., Pisarenko A. M., Fridman M. V., Baragina Z. N., Mankovskaya S. V., Papok V. E. "Non-operable thyroid cancer: effectiveness of diagnosis and survival", *Onkologicheskii zhurnal* [Oncological Journal], 2008, no. 8, pp. 9–21.

4. Zhavrid E. A., Antonenkova N. N., Prokhorova V. I., Lappo S. V. "Role of molecular hours in pathogenesis and therapy of malignant tumors", *Meditsinskaya panorama* [Medical panorama], 2011, no. 7, pp. 19–23.

5. Smith M. A., Altekruse S. F., Adamson P. C., Reaman G. H., Seibel N. L. "Declining childhood, adolescent cancer mortality", *Cancer*, 2014, no. 120, pp. 2497–2506.

6. Applebaum M. A., Worch J., Matthay K. K., Goldsby R., Neuhaus J., West D. C., Dubois S. G. "Clinical features, outcomes in patients with extraskeletal Ewing sarcoma", *Cancer*, 2011, vol. 117 (13), pp. 3027–3032.

7. Arndt V., Lacour B., Steliarova-Foucher E., Spix C., Znaor A., Pastore G., Stiller C., Brenner H. "Up-to-date monitoring of childhood cancer long-term survival in Europe: tumours of the sympathetic nervous system, retinoblastoma, renal, bone tumours, soft tissue sarcomas", *Annals of Oncology*, 2007, no. 18, pp. 1722–1733.

8. Raney R. B., Asmar L., Newton W. A. Jr, Bagwell C., Breneman J. C., Crist W., Gehan E. A., Webber B., Wharam M., Wiener E. S., Anderson J. R., Maurer H. M. "Ewing's sarcoma of soft tissues in childhood: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study, 1972 to 1991", *Journal of Clinical Oncology*, 1997, vol. 15 (2), pp. 574–582.

9. Petrovich S., Aleinikova O., Shumikhina T. "Epidemiological aspects of child oncohematological morbidity in the Republic of Belarus", *Voprosy onkologii* [Problems in Oncology], 2002, vol. 48 (3), pp. 301–305.

10. Raney R. B., Anderson J. R., Barr F. G., Donaldson S. S., Pappo A. S., Qualman S. J., Wiener E. S., Maurer H. M., Crist W. M. "Rhabdomyosarcoma, undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group experience, rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V", *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2001, no. 23, pp. 215–220.

11. Paulussen M., Craft A. W., Lewis I., Hackshaw A., Douglas C., Dunst J., Schuck A., Winkelmann W., Köhler G., Poremba C., Zoubek A., Ladenstein R., van den Berg H., Hunold A., Cassoni A., Spooner D., Grimer R., Whelan J., McTiernan A., Jürgens H. "Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment-cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients, assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients", *Journal of Clinical Oncology*, 2008, no. 26, pp. 4385–4393.

12. Granowetter L., Womer R., Devidas M., Krailo M., Wang C., Bernstein M., Marina N., Leavey P., Gebhardt M., Healey J., Shamberger R. C., Goorin A., Miser J., Meyer J., Arndt C. A., Sailer S., Marcus K., Perlman E., Dickman P., Grier H. E. "Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumours: a Children's Oncology Group Study", *Journal of Clinical Oncology*, 2009, no. 27, pp. 2536–2541.

13. Oberlin O., Rey A., Desfachelles A. S., Philip T., Plantaz D., Schmitt C., Plouvier E., Lejars O., Rubie H., Terrier P., Michon J. "Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumours: a study by the Societe Francaise des Cancers de l'Enfant", *Journal of Clinical Oncology*, 2006, no. 24, pp. 3997–4002.

14. Juergens C., Weston C., Lewis I., Whelan J., Paulussen M., Oberlin O., Michon J., Zoubek A., Juergens H., Craft A. "Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumours in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial", *Pediatric Blood, Cancer*, 2006, no. 47, pp. 22–29.

15. De Gruttola V. G., Clax P., Demets D. L., Downing G. J., Ellenberg S. S., Friedman L., Gail M. H., Prentice R., Wittes J., Zeger S. L. "Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials. Summary of a National Institutes of Health Workshop", *Controlled Clinical Trials*, 2001, no. 22, pp. 485–502.

Информация об авторах

Киселёв Леонид Петрович – канд. мед. наук, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, д. 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: leonslight@mail.ru

Алейникова Ольга Витальевна – чл.-кор., д-р мед. наук, профессор, директор Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, д. 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: aleinikova2004@mail.ru

Information about the authors

Kisialeu Leanid Petrovich – Ph. D. (Med.), Chief of the Department. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: leonslight@mail.ru

Aleinikova Olga Vital'evna – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Director of Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: aleinikova2004@mail.ru

Для цитирования

Киселёв, Л. П. Примитивная нейроэктодермальная опухоль костей и мягких тканей у пациентов детского возраста Республики Беларусь: клинические исходы и показатели выживаемости за 15-летний период / Л. П. Киселёв, О. В. Алейникова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 38–45.

For citation

Kisialeu L., Aleinikova O. "Clinical outcomes and survival rates over the 15-year period in pediatric patients with peripheral primitive neuroectodermal tumor of bone and soft tissues". *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 38–45.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 577.34

Поступила в редакцию 13.10.2016
Received 13.10.2016

И. А. Чешик, А. Н. Никитин, Д. В. Сухарева, Е. А. Медведева, С. О. Гапоненко

Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЕМ-1 И EMX-GOLD НА БИОКИНЕТИКУ ^{137}CS В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Исследовано влияние микробиологических препаратов ЕМ-1 и EMX-Gold на накопление и выведение ^{137}Cs у белых лабораторных крыс-самцов при пероральном введении радионуклида. ЕМ-1 является симбиотическим комплексом культивируемых микроорганизмов: молочнокислых бактерий, дрожжевых грибов, пурпурных фотосинтезирующих бактерий. EMX-Gold – биологически активная добавка на основе экстракта из ЕМ-1, в состав которой входит набор вторичных метаболитов, выделенных из симбиотической культуры микроорганизмов. Содержание ^{137}Cs в суточном рационе составляло 34,95 ± 5,62 Бк/сут. Через 2 мес. содержания животных на корме, загрязненном ^{137}Cs, достигнута равновесная активность радиоизотопа в организме животных, составившая 210–230 Бк/кг. Через 8 сут после перевода на условно чистый рацион выведено 36–39 % накопленного ^{137}Cs. При хроническом пероральном поступлении ^{137}Cs его эффективный период полувыведения из организма 8-месячных крыс составил 352 ± 69 ч, 10-месячных – 394 ± 148 ч. Введение в рацион ЕМ-1 и EMX-Gold на протяжении 2 мес. сокращало период полувыведения цезия на 16–19 % ($p < 0,15$). При 4-месячном содержании крыс-самцов на загрязненном радиоактивным цезием рационе постоянное добавление в питьевую воду микробиологических добавок ЕМ-1 и EMX-Gold не изменяло скорость выведения радиоизотопа из организма.

Ключевые слова: цезий, период полувыведения, молочнокислые бактерии, пурпурные бактерии, дрожжевые грибы.

I. A. Cheshyk, A. N. Nikitin, D. V. Sukhareva, E. A. Medvedeva, S. O. Gaponenka

Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

IMPACT OF MICROBIOLOGICAL PREPARATIONS EM-1 AND EMX-GOLD ON BIOKINETICS OF ^{137}CS IN THE LABORATORY ANIMALS

The effect of microbiological preparations EM-1 and EMX-Gold on the accumulation and excretion of ^{137}Cs in white laboratory male rats after oral administration of radionuclide is investigated. EM-1 is a complex of symbiotic cultured microorganisms: lactic acid bacteria, yeasts, purple photosynthetic bacteria. EMX-Gold is a dietary supplement based on extracts from EM-1. It consists of a set of secondary metabolites isolated from the culture of the symbiotic microorganisms. The activity of ^{137}Cs in the daily diet was 34.95 ± 5.62 Bq/day. After two months of keeping animals on feed contaminated with ^{137}Cs, the equilibrium activity of radioisotope in the body of animals was reached. It is equal to 210–230 Bq/kg. Eight days after changing the diet free of the radioisotope feed, decreasing the ^{137}Cs activity concentration in the bodies of rats by 36–39 % is established. The effective half-life of ^{137}Cs in the bodies of 8-month-old rats under chronic 2-month ingestion of radioisotope was 352 ± 69 hours, for 10-month-old animals this index is equal to 394 ± 148 hours. Introduction of EM-1 or EMX-Gold into the diet over a period of 2 months reduces the effective half-life of ^{137}Cs by 16–19 % ($p < 0.15$). A permanent addition of the microbial preparation EM-1 or EMX-Gold to drinking water does not alter the rate of excretion of radionuclide from the body after the 4-month maintenance of male rats on a diet contaminated with radioactive cesium.

Keywords: cesium, half-life, lactic acid bacteria, purple bacteria, yeasts.

Введение. В число первоочередных задач развития ядерных технологий входит обеспечение радиационной безопасности человека и среды его обитания. Специфической особенностью ядерных технологий является образование и накопление искусственных радионуклидов, которые при неблагоприятных обстоятельствах могут поступать в окружающую среду. Многократно уступая по массе всем известным ксенобиотикам, по степени воздействия на биосистемы искусственные радионуклиды входят в число наиболее опасных загрязнителей.

Одними из наиболее опасных являются изотопы ^{134}Cs и ^{137}Cs. Они относятся к «глобальным» радионуклидам, довольно быстро распространяющимся в биосфере. Многочисленные исследования указывают на то, что способность аккумуляции цезия обнаруживается практически у всех живых организмов. Длительные периоды полураспада, высокая растворимость в воде солей цезия и сходство его физико-химических свойств с таким биологически важным катионом, как ка-

лий, обусловливают высокую биодоступность ^{134}Cs и ^{137}Cs в течение значительного времени после выброса в окружающую среду [1]. В связи с этим актуальным является поиск средств и способов, направленных на снижение аккумуляции радиоактивных изотопов цезия в организме и их ускоренного выведения.

^{137}Cs является бета-излучателем (энергия β-частиц – 170,8 кэВ), период его полураспада – 30,2 года. При распаде ^{137}Cs образуется гамма-излучающий ^{137m}Ba (энергия γ-квантов 661,6 кэВ). Период полураспада ^{137m}Ba – 2,55 мин, поэтому он не накапливается в образцах в значимых количествах. У ^{134}Cs период полураспада составляет 2,062 года.

В организме взрослого человека содержится около 1,5 мг стабильного цезия, а суточное поступление оценивается в 10 мкг [2]. Радиоактивные изотопы цезия могут попасть в организм с продуктами питания растительного или животного происхождения. Данный элемент хорошо усваивается желудочно-кишечным трактом (ЖКТ) млекопитающих. Степень всасывания ^{137}Cs в ЖКТ достигает 100 %, так как он образует хорошо растворимые соединения. У молодых особей цезий усваивается лучше, чем у старых, по метаболическим причинам.

Обмен цезия в организме имеет много общего с обменом калия. Около 80 % ^{137}Cs скапливается в мышечной ткани, около 10 % – в скелете и еще 10 % распределяется в остальных органах и тканях. При прочих равных условиях в организме мужчин накапливается на 40–70 % больше цезия, чем у женщин [3]. Причем с возрастом эта разница увеличивается. Цезий способен в значительных количествах поступать в плод через плаценту, а также в грудное молоко.

Во время длительного поступления радионуклидов в организм скорость их накопления существенно меняется. Вначале накопление происходит интенсивно, а затем, по мере насыщения тканей, постепенно замедляется, и, наконец, наступает равновесие между вновь поступающей активностью и экскретируемой. С этого периода дальнейшего увеличения содержания радионуклидов в организме практически не происходит. Время, в течение которого устанавливается равновесие, определяется прежде всего природой радионуклидов, кроме того, оно сильно зависит от вида и напрямую связано с уровнем обмена веществ.

Около 90 % цезия выводится из организма с мочой, остальное – через кишечник. Следует отметить, что значительная часть выводимого через кишечник цезия подвергается обратному всасыванию в нижних отделах ЖКТ. При более подробном рассмотрении закономерностей выведения цезия из организма выделяют две компоненты – быструю, составляющую около 10 % от запаса радионуклида в организме (период биологического полувыведения около суток), и медленную (период биологического полувыведения 50–200 сут). Исследователи отмечают существенную вариабельность в скорости выведения цезия из организма. Она зависит от физиологического состояния организма, возраста, режима питания и питья, обеспеченности калием. У новорожденных период полувыведения цезия составляет около 10 сут, у младенцев – 25, у детей 6–16 лет – 46–57 сут. Международный комитет по радиационной защите рекомендует считать биологический период полувыведения цезия из организма человека равным 70 сут.

Сходные возрастные закономерности особенностей выведения цезия из организма установлены и у лабораторных животных. Период эффективного полувыведения быстрой компоненты у крысят составляет около 2 сут, а у взрослых животных – 8 сут. Для медленной компоненты аналогичные показатели составляют 36 и 37 сут [3].

Относительно равномерное распределение цезия в организме и высокая проникающая способность гамма-квантов дочернего радионуклида ^{137m}Ba (около 12 см в биологических тканях) приводят к почти равномерному облучению органов и тканей. У человека острые биологические эффекты наблюдаются при поступлении в организм порядка 1 ГБк ^{137}Cs. Это сопоставимо с дозой внешнего облучения 4–6 Гр. При поступлении в организм человека радиоцезия в дозе 0,4–4,0 МБк на 1 кг массы тела развивается хроническая лучевая болезнь, со временем проявляются отдаленные последствия (бластомогенные эффекты, катаракты, раннее старение). При однократном поступлении ^{137}Cs безопасной для человека считается доза 2,0 МБк на 1 кг массы тела [4].

Одним из факторов, влияющих на показатели усвоения и выведения цезия из организма, является микрофлора кишечника, которая оказывает существенное влияние на сорбцию в нем минеральных элементов питания. Деятельность микроорганизмов и их биологически активных со-

единений может изменять активность мембранных насосов или проницаемость клеточных мембран. Кроме того, бактерии, переводя отдельные элементы в слаборастворимые формы или сорбируя их на собственной поверхности, могут делать эти элементы менее доступными для всасывания.

Высокая поглотительная способность в отношении цезия обнаружена в основном у водорослей [5, 6], грибов [8], дрожжей [9], цианобактерий [7, 10, 11]. Но видовые особенности бактерий в плане накопления цезия изучены недостаточно хорошо [12]. В основном исследования посвящены бактериям рода *Rhodococcus*, которые могут эффективно его аккумулировать [13–15]. В работе [16] показано, что не все бактерии способны накапливать данный катион. Известно, что Cs^+ не обладает какой-либо важной биологической функцией. Однако с помощью транспортных систем одновалентных катионов, таких как K^+ [4], NH_4^+ [10, 11], он может поступать внутрь клетки и замещать K^+ при росте и активации ферментов [17, 18].

К настоящему времени разработаны и нашли практическое применение сорбенты, предназначенные для ускорения выведения цезия и других радионуклидов из организма. Используются они в случае возникновения аварийной ситуации, сопровождающейся поступлением цезия через органы дыхания или перорально. Применение подобных препаратов в условиях хронического поступления радионуклидов в организм (например, при проживании на загрязненных территориях) нецелесообразно по ряду причин. Поэтому наряду с разработкой системы мер по снижению поступления техногенных радионуклидов в организм человека с продуктами питания целесообразным оказывается поиск пищевых добавок, способствующих более быстрому их выведению.

Возможность использования микробиологических добавок для коррекции биокинетических параметров цезия в организме млекопитающих практически не исследована.

Цель данной работы – анализ влияния препаратов, основанных на использовании культур живых микроорганизмов или культуральных сред на биокинетические параметры ^{137}Cs в организме белых крыс.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проведен на белых лабораторных крысах-самцах стадного разведения в условиях вивария. Возраст животных на начало эксперимента составлял 6 мес.

Животные были разделены на следующие группы (по 14 особей в каждой):

группа 1 (контроль) – животные получали корма, загрязненные ^{137}Cs;

группа 2 (^{137}Cs + ЕМ-1) – крысы постоянно получали корма, загрязненные ^{137}Cs, с питьем – препарат ЕМ-1;

группа 3 (^{137}Cs + EMX-Gold) – животные постоянно получали корма, загрязненные ^{137}Cs, с питьем – препарат EMX-Gold.

Кормление животных всех групп кормом, загрязненным ^{137}Cs, производилось на протяжении 135 сут с установленными перерывами (7 и 8 сут) для оценки периода полувыведения ^{137}Cs из организма. Содержание ^{137}Cs в суточном рационе составляло 34,95 ± 5,62 Бк/сут. Радиоизотоп вводили в корм в виде загрязненной почвы, смешанной с кашей, и скармливали индивидуально каждому животному.

Прижизненные измерения удельной активности (Бк/кг) проводились 4 раза в две серии – каждая после 2-месячного приема загрязненного корма и через 7–8 сут приема условно чистого рациона.

Содержание ^{137}Cs в организме животных оценивали с помощью гамма-спектрометра Ortec с германиевым детектором GEM-40200-P. Животное помещалось в обездвиживающий пластиковый пенал и находилось в свинцовой камере детектора 10–15 мин до момента набора количества импульсов, достаточного для определения активности радионуклида (вероятность ошибки – не более 5–7 %). Для определения истинного содержания ^{137}Cs организме производили калибровку метода на основании сопоставления показаний прибора при помещении на детектор живого животного и средневзвешенной пробы его тканей и органов в стандартной геометрии «дента». На основании калибровки рассчитан поправочный коэффициент, равный 2,31 ± 0,12.

Для коррекции биокинетических свойств ^{137}Cs в организме лабораторных животных использовали микробиологические препараты – ЕМ-1 и EMX-Gold, предоставленные компанией-производителем EMRO (Япония).

ЕМ-1 является симбиотическим комплексом культивируемых непатогенных микроорганизмов, выделенных из природных объектов: молочнокислых бактерий, дрожжевых грибов, пурпурных фотосинтезирующих бактерий.

EMX-Gold – биологически активная добавка на основе экстракта из ЕМ-1, в состав которой входит набор вторичных метаболитов, выделенных из симбиотической культуры микроорганизмов. Среди метаболитов присутствуют вещества с выраженной антивоспалительной и антиоксидантной активностью.

Для статистической обработки полученных данных использовали методы параметрической статистики.

Период полувыведения ^{137}Cs оценивали отдельно для каждого животного во всех группах на основании разницы активности радионуклида между первым и вторым измерением в каждой из двух серий. Период полувыведения (T, ч) рассчитывали по формуле

$$T = 0{,}3103t/\log(A_0/A_t),$$

где 0,3103 – округленное значение $\log_{10}(2)$; t – время между первым и вторым измерением, ч; A_0, A_t – активность радионуклида в организме животного при первом и втором измерениях соответственно.

Анализ литературных данных и результаты предыдущих экспериментов позволяют утверждать, что по результатам первого измерения в серии достигалась равновесная активность ^{137}Cs в организме животных, т. е. суточное поступление радионуклида было равно его суточному выведению. Зная период полувыведения и активность радионуклида в организме животного, легко определить величину суточного выведения, а следовательно, и всасывания радионуклида из просвета кишечника (E_d) по следующей формуле:

$$E_d = 1 - 2^{-24/T}A_e,$$

где A_e – равновесная активность радионуклида в организме животного; 24 – количество часов в одних сутках; T – период полувыведения радионуклида, ч. Соотношение суточного всасывания радионуклида в кровяное русло к активности этого радионуклида в суточном рационе является коэффициентом абсорбции.

Результаты и их обсуждение. Накопление радионуклидов в организме млекопитающих определяется такими факторами, как величина их поступления с кормом и водой, абсорбция в ЖКТ, перераспределение в органах и тканях, биологическое выведение с продуктами жизнедеятельности. Главный накопитель цезия в организме млекопитающих – мышцы, сердце, печень.

Удельную активность ^{137}Cs в организме крыс в первой серии измерений оценивали в каждой группе животных после 60 сут потребления загрязненного корма, а затем – через 8 сут после нахождения на условно чистом рационе. В момент равновесия средняя активность радиоизотопа в организме животных достигала 210–230 Бк/кг (рис. 1). За 8 сут выведено 36–39 % накопленного ^{137}Cs. Анализ полученных данных показал, что удельная активность ^{137}Cs в организме животных, получавших в качестве добавки препарат EMX-Gold, несколько ниже контрольных значений, однако это снижение

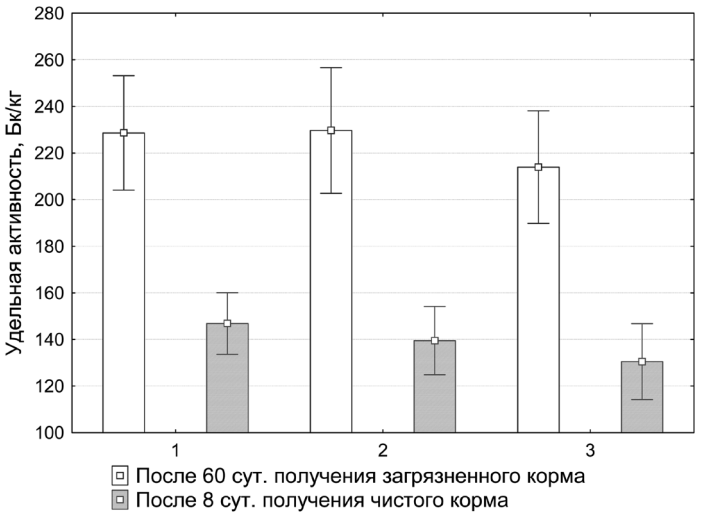


Рис. 1. Удельная активность ^{137}Cs в организме крыс по результатам первой серии измерений: *1* – контроль; *2* – ЕМ-1; *3* – EMX-Gold

Fig. 1. Activity concentration of ^{137}Cs in bodies of white rats in the first series of measurements: *1* – control; *2* – EM-1; *3* – EMX-Gold

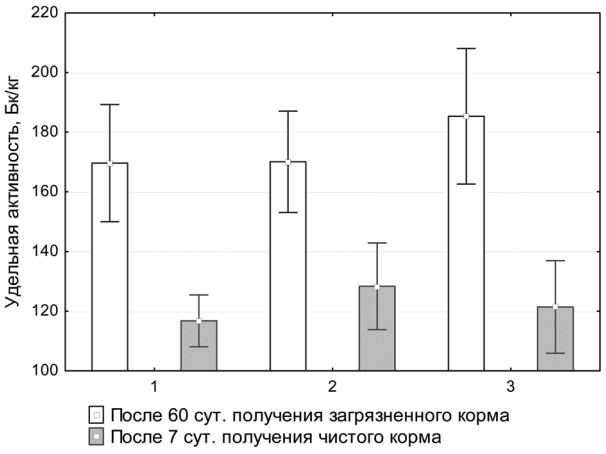


Рис. 2. Удельная активность ^{137}Cs в организме крыс по результатам второй серии измерений: *1* – контроль; *2* – EM-1; *3* – EMX-Gold

Fig. 2. Activity concentration of ^{137}Cs in bodies of white rats in the second series of measurements: *1* – control; *2* – EM-1; *3* – EMX-Gold

статистически недостоверно. В этой же группе наблюдалась тенденция к снижению удельной активности ^{137}Cs относительно таковой в группе животных, получавших в качестве добавки EM-1 и контроля после 8-суточной отмены загрязненного ^{137}Cs корма и замены его на аналогичный условно чистый корм.

Оценка содержания ^{137}Cs в организме животных по результатам второй серии измерений представлена на рис. 2. К моменту достижения биокинетического равновесия после 4-месячного приема загрязненного корма наблюдалась противоположная по сравнению с результатами первой серии измерений картина. Группа животных, принимавшая EMX-Gold, отличалась не только самым высоким уровнем накопления ^{137}Cs в организме, но и наибольшей вариабельностью этого показателя по сравнению с таковым в других группах. Спустя 7 сут после перевода на условно чистый рацион минимальные значения удельной активности ^{137}Cs отмечались в организме контрольных животных.

Повторное измерение удельной активности ^{137}Cs в организме животных через заданный промежуток времени после перевода на условно чистый рацион позволило рассчитать эффективный период полувыведения радионуклида из организма. Результаты оценки периода полувыведения ^{137}Cs из организма животных после первой серии измерений имеют достоверные различия с контролем лишь при уровне значимости 0,15 (рис. 3). Биокинетика цезия в организме экспериментальных животных имела высокую степень вариабельности, что позволяет утверждать лишь о наличии тенденции к ускорению экскреции радиоизотопа из организма при введении в рацион микробиологических препаратов EM-1 или EMX-Gold. Наименьший период полувыведения радиоизотопа выявлен в группе животных, получавших с питьем EMX-Gold (282 ± 59 ч), а наименьшая вариабельность показателя обнаружена в группе ^{137}Cs + EM-1.

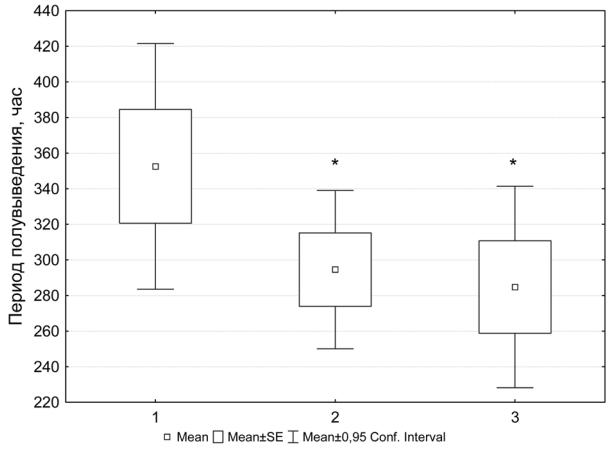


Рис. 3. Оценка периода полувыведения ^{137}Cs из организма животных по результатам первой серии измерений: *1* – контроль; *2* – EM-1; *3* – EMX-Gold; * – различия с контролем достоверны при уровне значимости 0,15

Fig. 3. Assessment of the effective half-life of ^{137}Cs in bodies of white rats in the first series of measurements: *1* – control; *2* – EM-1; *3* – EMX-Gold; * – the difference is reliable at the significance level of 0.15

Однако выявленная тенденция сохранялась лишь после первой серии измерений (после 2-месячного приема радиоактивного корма и микробиологических добавок). Более продолжительное введение в рацион загрязненного ^{137}Cs корма и микробиологических добавок приводило к несколько иному эффекту. Резко возрастала вариабельность периода полувыведения цезия из организма животных, не получавших микробиологические препараты. Хотя разница между средними значениями периода полувыведения радиоизотопа в контроле и группе ^{137}Cs + EMX-Gold была выше, чем после первой серии экспериментов, ее статистическая достоверность не подтверждена. Следует также обратить внимание на тот факт, что после второй серии измерений период полувыведения цезия в группе ^{137}Cs + EM-1 был на 44 % выше (различия достоверны при $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента), чем после первой серии измерений. Таким образом, продолжи-

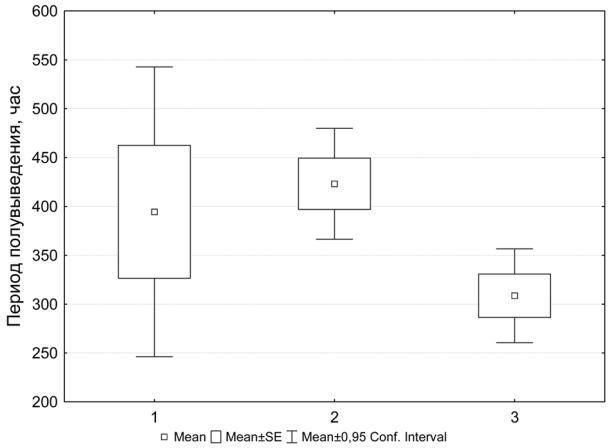


Рис. 4. Оценка периода полувыведения ^{137}Cs из организма животных по результатам второй серии измерений: *1* – контроль; *2* – ЕМ-1; *3* – EMX-Gold

Fig. 4. Assessment of the effective half-life of ^{137}Cs in bodies of white rats in the second series of measurements: *1* – control; *2* – EM-1; *3* – EMX-Gold

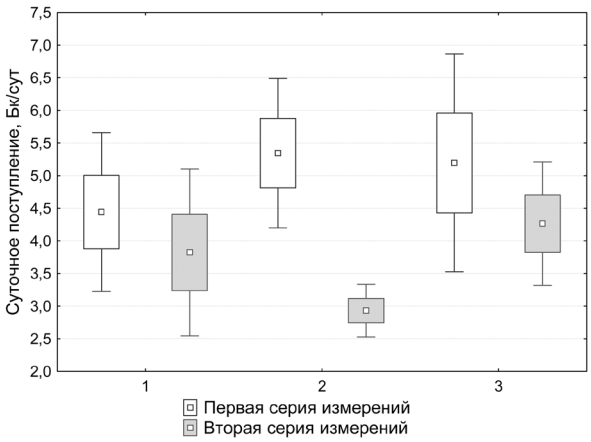


Рис. 5. Оценка суточного поступления ^{137}Cs из загрязненного корма в организм животных: *1* – контроль; *2* – ЕМ-1; *3* – EMX-Gold

Fig. 5. Assessment of the daily intake of ^{137}Cs from contaminated feed in bodies of white rats: *1* – control; *2* – EM-1; *3* – EMX-Gold

тельный прием ЕМ-1 с питьевой водой сопровождался увеличением периода полувыведения цезия из организма. В остальных экспериментальных группах подобного эффекта не наблюдалось.

Таким образом, результаты эксперимента показывают, что 2-месячный прием микробиологических препаратов EMX-Gold или ЕМ-1 способствует ускорению выведения ^{137}Cs из организма. Но при более продолжительном сроке приема данный эффект теряется. Данный факт можно объяснить тем, что испытываемые препараты оказывают воздействие на интенсивность экскреции ^{137}Cs из организма, а входящие в их состав микроорганизмы способны не только сорбировать радионуклид на клеточной стенке и в цитоплазме (в случае ЕМ-1), но и повышать эффективность абсорбции цезия в кровяное русло из просвета кишечника. Следует отметить, что используемая в эксперименте почва содержала лишь небольшую долю ^{137}Cs в биологически доступной форме. Практически весь запас радионуклида в ней находился в трудно извлекаемых формах. В связи с этим важно было оценить суточное поступление ^{137}Cs в организм животных.

Анализ полученных данных показал лишь слабую тенденцию к повышению усвояемости ^{137}Cs из рациона на фоне приема микробиологических препаратов спустя 2 мес. после начала эксперимента (рис. 5). В последующем и этого эффекта не выявлено.

Выводы

1. В условиях хронического перорального поступления ^{137}Cs эффективный период полувыведения радиоизотопа из организма 8-месячных крыс-самцов, содержащихся на стандартном рационе, составляет 352 ± 69 ч, 10-месячных – 394 ± 148 ч.

2. Введение в рацион крыс-самцов микробиологических препаратов ЕМ-1 и EMX-Gold на протяжении 2 мес. сокращает период полувыведения цезия на 16–19 %, однако различия с контролем достоверны только при уровне значимости 0,15.

3. При 4-месячном содержании крыс-самцов на загрязненном радиоактивным цезием рационе постоянное добавление в питьевую воду микробиологических добавок ЕМ-1 и EMX-Gold не изменяет скорость выведения радиоизотопа из организма.

Список использованных источников

1. Кузьменко, М. И. Радиоэкология природных вод на стыке тысячелетий / М. И. Кузьменко, Г. Г. Поликарпов // Гидробиол. журн. – 2000. – Т. 36, № 2. – С. 60–76.

2. Василенко, И. Я. Радиоактивный цезий / И. Я. Василенко, О. И. Василенко // Энергия: экономика, техника, экология. – 2001. – № 7. – С. 16–22.

3. Радиобиология инкорпорированных радионуклидов / В. С. Калистратова [и др.]; под ред. В. С. Калистратовой. – М.: Изд-во ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, 2012. – 464 с.

4. Булдаков, Л. А. Радиоактивные вещества и человек / Л. А. Булдаков. – М.: Энергоатомиздат, 1990. – 160 с.

5. Avery, S. V. Replacement of cellular potassium by caesium in *Chlorella emersonii*: differential sensitivity of photoautotrophic and chemoheterotrophic growth / S. V. Avery, G. A. Godd, G. M. Gadd // J. Gen. Microbiol. – 1992. – Vol. 138. – P. 69–76.

6. Avery, S. V. Transport kinetics, cation inhibition and intracellular location of accumulated caesium in the green microalga *Chlorella salina* / S. V. Avery, G. A. Codd, G. M. Gadd // J. Gen. Microbiol. – 1993. – Vol. 139. – P. 827–834.

7. Avery, S. V. Caesium accumulation and interactions with other monovalent cations in the cyanobacterium *Synechosystis PCC 6803* / S. V. Avery, G. A. Codd, G. M. Gadd // J. Gen. Microbiol. – 1991. – Vol. 137. – P. 405–413.

8. Bakken, L. R. Accumulation of radiocaesium in fulgi / L. R. Bakken, R. A. Olsen // Can. J. Microbiol. – 1990. – Vol. 36. – P. 704–710.

9. Perkins, J. Caesium toxicity, accumulation and intracellular localization in yeast / J. Perkins, G. M. Gadd // Mycol. Res. – 1993. – Vol. 97, N 6. – P. 717–724.

10. Avery, S. V. Caesium transport in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*: kinetics and evidence for uptake via ammonium transport system(s) / S. V. Avery, G. A. Codd, G. M. Gadd // FEMS Microbiol. Lett. – 1992. – Vol. 95. – P. 253–258.

11. Common nitrogen control of caesium uptake, caesium toxicity and ammonium (methylammonium) uptake in the cyanobacterium *Nostoc muscorum* / S. Singh [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1994. – Vol. 117, N 3. – P. 243–248.

12. Perkins, J. The influence of pH and external K+ concentration on caesium toxicity and accumulation in *Escherichia coli* and Bacillus subtilis / J. Perkins, G. M. Gadd // J. Ind. Microbiol. – 1995. – Vol. 14, N 34. – P. 218–225.

13. Tomioka, N. Isolation and Characterization of Cesium Accumulating Bacteria / N. Tomioka, H. Uchiyama, O. Yagi // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58, N 3. – P. 1019–1023.

14. Tomioka, N. Cesium Accumulation and Growth Characteristics of *Rhodococcus erythropolis CS98* and *Rhodococcus sp. Strain CS402* / N. Tomioka, H. Uchiyama, O. Yagi // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60, N 7. – P. 2227–2231.

15. Ившина, И. Б. Эффективное извлечение цезия клетками бактерий рода *Rhodococcus* / И. Б. Ившина, Т. А. Пешкур, В. П. Коробов // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 3. – С. 418–423.

16. Johnson, E. E. An autoradiographic technique for selecting ^{137}Cs sorbing microorganisms from soil / E. E. Johnson, A. G. O'Donnell, P. Ineson // J. Microbiol. Meth. – 1991. – Vol. 13. – P. 293–298.

17. Andersson, C. E. Activation of ribokinase by monovalent cations / C. E. Andersson, S. L. Mowbray // J. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 315, N 3. – P. 409–419.

18. Jasper, P. Potassium transport system of *Rhodopseudomonas capsulate* / P. Jasper // J. Bacteriol. – 1978 – Vol. 133, N 3. – P. 1314–1322.

References

1. Kuz'menko M. I., Polikarpov G. G. "Radioecology of natural waters in the turn of the millennium", *Gidrobiologicheskii zhurnal* [Hydrobiological Journal], 2000, vol. 36, no. 2, pp. 60–76.

2. Vasilenko I. Ya., Vasilenko O. I. "Radioactive cesium", *Energiya* [Energy]: ekonomika, tekhnika, ekologiya, 2001, no. 7, pp. 16–22.

3. Kalistratova V. S., Belyaev I. K., Zhorov E. S., Nisimov P. G., Parfenova I. M., Tishchenko G. S., Tsapkov M. M. *Radiobiologiya inkorporirovannykh radionuklidov* [Radiobiology of incorporated radionuclides], in Kalistratova V. S. (ed.), FMBC named after A. I. Burnazyan FMBA of Russia, Moscow, RU, 2012.

4. Buldakov L. A. *Radioaktivnye veshchestva i chelovek* [Radioactive substances and man], Energoatomizdat, Moscow, RU, 1990.

5. Avery S. V., Godd G. A., Gadd G. M. "Replacement of cellular potassium by caesium in *Chlorella emersonii*: differential sensitivity of photoautotrophic, chemoheterotrophic growth", *Journal of General Microbiology*, 1992, vol. 138, pp. 69–76.

6. Avery S. V., Godd G. A., Gadd G. M. "Transport kinetics, cation inhibition, intracellular location of accumulated caesium in the green microalga *Chlorella salina*", *Journal of General Microbiology*, 1993, vol. 139, pp. 827–834.

7. Avery S. V., Godd G. A., Gadd G. M. "Caesium accumulation, interactions with other monovalent cations in the cyanobacterium *Synechosystis PCC 6803*", *Journal of General Microbiology*, 1991, vol. 137, pp. 405–413.

8. Bakken L. R., Olsen R. A. "Accumulation of radiocaesium in fulgi", *Canadian Journal of Microbiology*, 1990, vol. 36, pp. 704–710.

9. Perkins J., Gadd G. M. "Caesium toxicity, accumulation, intracellular localization in yeast", *Mycological Research*, 1993, vol. 97, no. 6, pp. 717–724.

10. Avery S. V., Codd G. A., Gadd G. M. "Caesium transport in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*: kinetics, evidence for uptake via ammonium transport system(s)", *FEMS Microbiology Letters*, 1992, vol. 95, pp. 253–258.

11. Singh S., Negi S., Bharati N., Singh H. N. "Common nitrogen control of caesium uptake, caesium toxicity, ammonium (methylammonium) uptake in the cyanobacterium *Nostoc muscorum*", *FEMS Microbiology Letters*, 1994, vol. 117, no. 3, pp. 243–248.

12. Perkins J., Gadd G. M. "The influence of pH, external K+ concentration on caesium toxicity, accumulation in *Escherichia coli* and Bacillus subtilis", *Journal of Industrial Microbiology*, 1995, vol. 14, no. 34, pp. 218–225.

13. Tomioka N., Uchiyama H., Yagi O. "Isolation, Characterization of Cesium Accumulating Bacteria", *Applied Environmental Microbiology*, 1992, vol. 58, no. 3, pp. 1019–1023.

14. Tomioka N., Uchiyama H., Yagi O. "Cesium Accumulation, Growth Characteristics *of Rhodococcus erythropolis CS98* and *Rhodococcus sp. Strain CS402*", *Applied Environmental Microbiology*, 1994, vol. 60, no. 7, pp. 2227–2231.

15. Ivshina I. B., Peshkur T. A., Korobov V. P. "Efficient extraction of cesium by the cells of bacteria *Rhodococcus*", *Mikrobiologiya* [Microbiology], 2002, vol. 71, no. 3, pp. 418–423.

16. Johnson E. E., O'Donnell A. G., Ineson P. "An autoradiographic technique for selecting 137Cs sorbing microorganisms from soil", *Journal of Microbiological Methods*, 1991, vol. 13, pp. 293–298.

17. Andersson C. E., Mowbray S. L. "Activation of ribokinase by monovalent cations", *Journal of Molecular Biology*, 2002, vol. 315, no. 3, pp. 409–419.

18. Jasper P. "Potassium transport system of *Rhodopseudomonas capsulate*", *Journal of Bacteriology*, 1978, vol. 133, no. 3, pp. 1314–1322.

Информация об авторах

Чешик Игорь Анатольевич – канд. мед. наук, доцент, директор Института радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: igor.cheshik@gmail.com

Никитин Александр Николаевич – канд. с/х наук, заведующий лабораторией. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: nikitinale@gmail.com

Сухарева Диана Витальевна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: dianasuhareva@yandex.ru

Медведева Елена Анатольевна – мл. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: irb-2013@yandex.by

Гапоненко Сергей Олегович – мл. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: ma2856@mail.ru

Information about the authors

Cheshyk Ihar Anatol'evich – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Director of Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: igor.cheshik@gmail.com

Nikitin Aleksander Nikolaevich – Ph. D. (Agricult.), Head of the Laboratory. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: nikitinale@gmail.com

Sukhareva Diana Vital'evna – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: dianasuhareva@yandex.ru

Medvedela Elena Anatol'evna – Junior researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: irb-2013@yandex.by

Gaponenka Sergey Olegovich – Junior researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninskogo Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: ma2856@mail.ru

Для цитирования

Влияние микробиологических препаратов ЕМ-1 и EMX-Gold на биокинетику ^{137}Cs в организме лабораторных животных / И. А. Чешик [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 46–53.

For citation

Cheshyk I. A., Nikitin A. N., Sukhareva D. V., Medvedeva E. A., Gaponenka S. O. "Impact of microbiological preparations EM-1 и EMX-Gold on biokinetics of ^{137}Cs in the laboratory animals". *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 46–53.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616.831-005.8-036.11:616.133

Поступила в редакцию 28.11.2016
Received 28.11.2016

Е. И. Гайшун[1], И. В. Гайшун[2]

[1]1-я городская клиническая больница, Минск, Республика Беларусь
[2]Институт математики НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ПОТЕРИ ДАВЛЕНИЯ ВО ВНУТРЕННЕЙ СОННОЙ АРТЕРИИ В ТОЧКЕ БИФУРКАЦИИ В НОРМЕ И ПРИ НАРУШЕНИЯХ ГЕМОДИНАМИКИ

С помощью математического моделирования установлено, что потери давления во внутренней сонной артерии в точке бифуркации общей сонной артерии при отсутствии нарушения геометрии указанных артерий практически не происходит. При нарушении геометрии наблюдаются некоторые потери давления, определяемые типом и выраженностью патологии, а также местом ее расположения относительно точки бифуркации.

Ключевые слова: внутренняя сонная артерия, бифуркация, потеря давления.

E. I. Gaishun[1], I. V. Gaishun[2]

[1]1th City Hospital, Minsk, Republic of Belarus
[2]Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

PRESSURE LOSSES IN THE INTERNAL CAROTID ARTERY AT THE BIFURCATION POINT AT NORMAL HEMODYNAMICS AND AT ITS DISTURBANCES

By means of mathematical modeling of pressure losses in the internal carotid artery at the point of bifurcation of the common carotid artery it is established that in the absence of the violation of the geometry of the above arteries, pressure losses practically do not occur. At the geometry violation, some pressure losses determined by the type and expression of pathology, as well as by the place of its location relative to the bifurcation point are observed.

Keywords: internal carotid artery, bifurcation, pressure loss.

Введение. Потери давления в артериальных сосудах складываются из потерь давления вследствие гидравлического трения, вызванного вязкостью крови, и из местных потерь давления, связанных с изменениями геометрии сосуда (нарушение прямолинейности хода, атеросклеротические поражения и др.). Известно [1–3], что от половины до двух третей всех ишемических инсультов ассоциируется с поражением, прежде всего атеросклеротического генеза, экстракраниальных артерий головного мозга. Наряду с атеросклеротическими изменениями важное значение при нарушении мозгового кровообращения имеют патологические извитости внутренней сонной артерии (ВСА) [4–7]. И та и другая патологии приводят к потере давления в области их локализации, что по закону Пуазейля уменьшает объемный кровоток и тем самым ухудшает обеспечение кровью сосудов головного мозга.

Помимо указанных патологических зон потери давления областью возможного местного сопротивления является точка бифуркации общей сонной артерии (ОСА) на внутреннюю и наружную (НСА) сонные артерии. Существует ряд математических моделей бифуркации сосудов [8–10]. Однако все они основаны на большом количестве параметров, достаточно сложны и не могут быть использованы в повседневной клинической практике. Если же задачу сузить до определения потери давления, то можно получить простые расчетные формулы, учитывающие данные только стандартного ультразвукового исследования сосуда; точность таких формул оказывается вполне удовлетворительной.

При анализе потери давления в ВСА в точке бифуркации следует различать два случая: 1) геометрия ОСА и ВСА не нарушена ни атеросклеротическим поражением, ни патологической извитостью; 2) в ОСА и ВСА наблюдается хотя бы одна из указанных патологий. В первом случае область бифуркации является областью изолированного местного сопротивления, во втором

© Гайшун Е. И., Гайшун И. В., 2017

случае на течение крови в точке бифуркации существенное влияние оказывает местное сопротивление в пораженных участках артерий. Следовательно, каждый из этих случаев требует отдельного изучения.

Цель исследования – разработать математическую модель, позволяющую оценить потери давления во внутренней сонной артерии в точке бифуркации как в норме, так и при патологических извитостях и атеросклеротических поражениях.

Материалы и методы исследования. Область бифуркации ОСА схематически изображена на рис. 1. В норме ОСА и экстракраниальный участок ВСА имеют прямолинейный ход, диаметры этих артерий относительно постоянны, причем диаметр ВСА, как правило, больше, чем диаметр НСА. В ВСА направляется примерно 2/3 крови, переносимой ОСА, в НСА – 1/3. Область бифуркации можно охарактеризовать такими геометрическими и гемодиначескими параметрами, как коэффициент ветвления k ($k = S_{ВСА} + S_{НСА})/S_{ОСА}$, где $S_{ВСА}$, $S_{НСА}$ и $S_{ОСА}$ – площади поперечных сечений ВСА, НСА и ОСА в точке бифуркации), угол ветвления α (по данным [11], угол α обычно составляет 30–40°); радиусы кривизны делителя потока (рис. 1, зона (2)) и сосудистой стенки в точке ветвления (рис. 1, зона (3)).

Кроме этих параметров, на течение крови существенное влияние оказывают пиковые (максимальные) скорости $w_{ОСА}$, $w_{ВСА}$ и $w_{НСА}$ кровотока в ОСА, ВСА и НСА, а также число Рейнольдса ($\mathrm{Re} = \frac{\rho w d}{\mu}$, где w – скорость потока, м·с$^{-1}$, ρ – плотность крови (1060 кг·м$^{-3}$), μ – вязкость крови ((3–5)·10^{-3} Па·с), d – диаметр сосуда, м).

Определенное воздействие на кровоток оказывает и каротидный синус (1), представляющий собой расширенную начальную часть ВСА, которая сильно иннервирована баро- и хеморецепторами и играет важную роль в регуляции кровообращения.

Картина течения крови в области бифуркации достаточно сложна. В первую очередь из-за разделения потока нарушается симметричность профиля скоростей. Сразу же за делителем потока зона наибольших скоростей оказывается в непосредственной близости к внутренней стенке отходящих ветвей. Кроме того, в точке бифуркации искривляются линии тока, что сопровождается асимметрией распределения давления и приводит к поперечной циркуляции крови. В области каротидного синуса наблюдается физиологическая турбулентность [11] , что также усложняет движение потока.

Еще одна сложность связана с пульсирующим характером течения крови. Из-за периодического изменения скорости кровотока нельзя однозначно определить число Re, от которого зависит тип течения (ламинарный или турбулентный). По-видимому, в такой ситуации целесообразно использовать пиковое число Re при максимальной линейной скорости кровотока. Такой выбор можно обосновать тем, что возмущение потока чаще возникает при пиковой или близкой к ней скорости течения крови. Однако вряд ли тип течения определяется только пиковым числом Re, поскольку для того, чтобы возмущения превратились в турбулентность, необходимо некоторое время. Поэтому есть основание считать, что критическое число Re (после которого развивается турбулентность) будет возрастать при повышении частоты сердечных сокращений. Это означает, что в случае пульсирующего потока переход к турбулентности определяется не только числом Re, но и числом Уомерсли [12]:

$$\alpha = \frac{d}{2}\sqrt{\frac{2\pi f \rho}{\mu}},$$

где f – частота сердечных сокращений, Гц, с увеличением которого возрастает и критическое число Re.

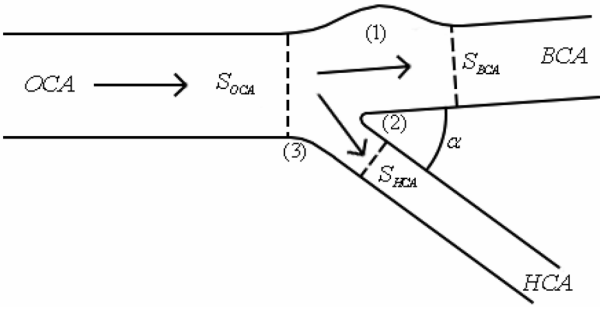


Рис. 1. Область бифуркации общей сонной артерии: (1) – каротидный синус, (2) – делитель потока. $S_{ВСА}$, $S_{НСА}$ и $S_{ОСА}$ – площади поперечных сечений внутренней (ВСА), наружной (НСА) и общей (ОСА) сонных артерий

Fig. 1. Field of bifurcation of the common carotid artery: (1) – the carotid sine, (2) –the stream divider. S_{ICA}, S_{ECA} and S_{CCA} – the areas of cross sections of internal (ICA), external (ECA) and common (CCA) carotid arteries

Перечисленные сложности не позволяют простыми методами описать течение крови в области бифуркации. Следует также добавить, что течение крови сильно зависит от изменения как геометрических характеристик зоны бифуркации, так и динамических параметров, что еще больше усложняет задачу. Поэтому в данной работе не ставилась цель полного анализа кровотока в условиях пульсирующего течения, а определялись только потери давления, когда градиент давления на входе в область бифуркации не изменяется во времени. Тем не менее, даже в таком упрощенном варианте данные о потере давления служат важной гемодинамической характеристикой зоны бифуркации.

Если в ВСА имеются атеросклеротические поражения или она является патологически извитой, значит, в ней существуют две области местного сопротивления: область бифуркации и патологический участок. Известно [13], что если области местного сопротивления расположены на расстоянии, большем чем 30–40 d (точнее, на расстоянии, большем чем $0{,}5L_{экв}$, где $L_{экв}$ – длина воображаемого участка артерии, на котором потеря давления на трение равна местной потере давления [14]), то общая потеря давления равна сумме потерь давления в области каждого сопротивления. Однако в силу небольшой длины ВСА и ОСА указанное условие часто не выполняется, поэтому ввиду влияния друг на друга местных сопротивлений суммирования потерь давления не происходит. В связи с этим далее оцениваются потери давления в ВСА в области бифуркации, когда геометрия артерии не нарушена и когда имеются атеросклеротические бляшки или патологические извитости.

Оценку потери давления проводили на основании модели области бифуркации, представленной на рис. 2. В этой модели, во-первых, не учитывается каротидный синус, во-вторых, делитель потока имеет острый угол, а не является закругленным, как это имеет место в действительности (рис. 2), в-третьих, НСА в момент ветвления делает резкий поворот, хотя на самом деле переход ОСА–НСА является плавным. Поэтому в предложенной модели выше вероятность отрыва потока (рис. 2, зона (1)) и образования завихрений (рис. 2, зона (2)), что может повлиять на оценки потерь давления. Кроме того, в модели не отражена вариабельность строения НСА (в частности, часто наблюдающийся «рассыпчатый» характер – деление в устье на несколько стволов), что также может влиять на потери давления. Однако, несмотря на указанные недостатки, основные, наиболее значимые для гемодинамики геометрические параметры в ней учтены.

Оценки потери давления, получаемые на основе модели, представленной на рис. 2, наиболее точны [13], если в зоне бифуркации площадь поперечного сечения ОСА меньше суммы площадей поперечных сечений ВСА и НСА и пиковая скорость кровотока в ВСА не выше пиковой скорости кровотока в ОСА, т. е.

$$S_{\text{ОСА}} < S_{\text{ВСА}} + S_{\text{НСА}},\ \ w_{\text{ВСА}} \le w_{\text{ОСА}}. \tag{1}$$

При нарушении этих условий точность оценок может снижаться.

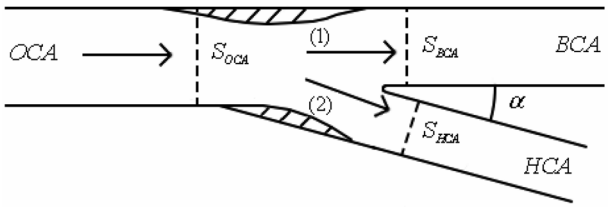


Рис. 2. Модель области бифуркации общей сонной артерии: (1) – зона возможного отрыва, (2) – возможная вихревая зона. $S_{\text{ВСА}}$, $S_{\text{НСА}}$ и $S_{\text{ОСА}}$ – площади поперечных сечений внутренней (ВСА), наружной (НСА) и общей (ОСА) сонных артерий

Fig. 2. Model of the field of bifurcation of the general carotid: (1) – the zone of a possible separation, (2) – a possible vortex zone. S_{ICA}, S_{ECA} and S_{CCA} – the areas of cross sections of internal (ICA), external (ECA) and the general (CCA) carotids arteries

Согласно [13], при выполнении неравенств (1) потери давления ΔP в ВСА в области бифуркации определяются по формуле

$$\Delta P = 0{,}35\left(1-\frac{w_{\text{ВСА}}}{w_{\text{ОСА}}}\right)^2 \frac{\rho w_{\text{ОСА}}^2}{2}. \tag{2}$$

Графически изображение зависимости величины ΔP от скоростей $w_{\text{ВСА}}$, $w_{\text{ОСА}}$ представлено на рис. 3.

Заметим, что в этой формуле отсутствуют коэффициент и угол ветвления, что на первый взгляд вызывает сомнение в ее точности, поскольку очевидно, что параметры k и α существенно влияют на характер течения крови. Однако на самом деле влияние их учитывает-

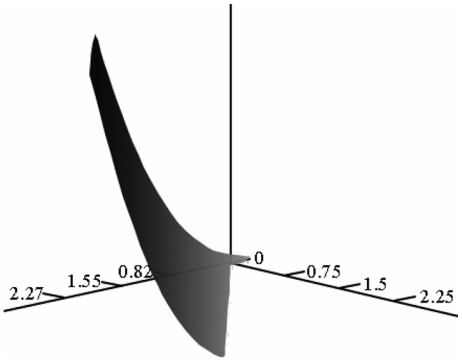


Рис. 3. Зависимость потери давления от скоростей

Fig. 3. Dependence of pressure loss vs. speeds

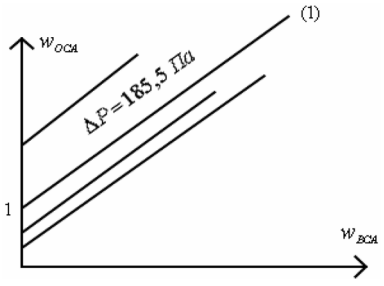


Рис. 4. Линии постоянства потерь давления

Fig. 4. Lines of constant pressure losses

ся в скоростях w_{BCA} и w_{OCA}, поэтому указанные параметры присутствуют в формуле (2) опосредованным образом.

Зависимость ΔP от скоростей w_{BCA}, w_{OCA} иногда удобно представлять линиями постоянства потерь давления (рис. 4), которые являются графиками уравнения

$$w_{\text{OCA}} = w_{\text{BCA}} + \sqrt{\frac{\Delta P}{185{,}5}}$$

при различных значениях ΔP. Каждая такая линия характеризуется тем, что потеря давления в ВСА не зависит от скоростей w_{BCA} и w_{OCA}, если точки (w_{BCA}, w_{OCA}) расположены на ней. Например, точки (0,5; 1,5), (0,7; 1,7), (0,3; 1,3) лежат на линии (1), поэтому соответствующие скорости w_{BCA}, w_{OCA} приводят к одинаковой потере давления (ΔP = 185,5 Па).

Завершая описание разработанной нами модели области бифуркации, отметим, что геометрией этой области, представленной на рис. 2, не исчерпываются возможные типы ветвления ОСА на ВСА и НСА. Согласно классификации, приведенной в [15], существует 8 основных вариантов бифуркации ОСА, 2 из которых (С-тип ВСА и симметричное ветвление с увеличенным углом α) не в полной мере соответствуют нашей модели. Естественно, в этих случаях точность ее снижается.

В исследование была включена группа из 20 человек (10 мужчин и 10 женщин, средний возраст 25,8 ± 3,6 года) без патологических изменений ОСА и ВСА и несколько пациентов, у которых наблюдались нарушения геометрии ОСА и ВСА. Основные параметры области бифуркации в сформированной группе: k = 1,5 ± 0,2, w_{OCA},w_{BCA} и w_{HCA} – 0,67 ± 0,13; 0,61 ± 0,12 и 0,52 ± 0,09 м·с$^{-1}$ соответственно.

Результаты и их обсуждение. Анализ формулы (2) позволяет сделать следующий вывод. Потери давления в точке бифуркации ВСА возрастают, если увеличивается пиковая скорость w_{OCA} и уменьшается соотношение $w_{\text{BCA}}/w_{\text{OCA}}$. Значит, чем выше пиковая скорость кровотока в ОСА и ниже пиковая скорость кровотока в ВСА, тем значительнее потери давления в ВСА. При отсутствии патологических изменений в ОСА и ВСА соотношение $w_{\text{BCA}}/w_{\text{OCA}}$ близко к 1, $w_{\text{OCA}} < 1$, поэтому потеря давления в этом случае мала. Согласно расчетам, выполненным по формуле (2), ΔP = 1,1 ± 1,2 Па. Таким образом, если геометрия зоны бифуркации не нарушена (нет извитостей и атеросклеротических бляшек), то потерь давления в ВСА из-за ветвления ОСА практически не происходит.

При нарушении геометрии потери давления небольшие. Нами обследовано 4 пациента со стенозирующим атеросклерозом и нарушением сосудистой геометрии. Результаты обследования представлены в таблице.

Следует подчеркнуть, что общие потери давления в ВСА могут оказаться большими, чем указано в таблице, поскольку помимо потерь в области бифуркации имеют место дополнительные потери как из-за нарушения сосудистой геометрии (их можно рассчитать по методике [16]), так и из-за склеротических поражений. Поэтому для того, чтобы оценить общие потери, необхо-

Скорости $w_{ОСА}$, $w_{ВСА}$ и потеря давления ΔP у пациентов со стенозирующим атеросклерозом и нарушением сосудистой геометрии

Speeds w_{CCA}, w_{ICA} and pressure loss ΔP in the patients with obliterating atherosclerosis and vascular geometry violation

Пол, возраст	$w_{ОСА}$, м·с$^{-1}$	$w_{ВСА}$, м·с$^{-1}$	ΔP, Па
Жен., 67 лет	1,42	0,75	83,4
Жен., 59 лет	1,12	0,52	66,8
Муж., 69 лет	1,26	0,69	60,3
Муж., 70 лет	1,39	0,67	96,2

димы дополнительные исследования, ибо, как уже отмечалось, местные сопротивления могут оказывать влияние друг на друга, при этом степень их влияния зависит не только от типа и выраженности патологии, но и от взаимного расположения областей сопротивления.

Заключение. Предложена математическая модель для оценки потери давления в ВСА в точке бифуркации ОСА. На основании этой модели установлено, что при отсутствии патологических изменений в ОСА и ВСА (отсутствие извитостей и атеросклеротических поражений) указанные потери практически равны нулю. В случае нарушений геометрии ОСА и ВСА или наличия в них атеросклеротических бляшек наблюдаются определенные потери давления в ВСА, вызванные бифуркацией ОСА. Величина этих потерь зависит от типа и выраженности патологии, а также от места ее расположения относительно точки бифуркации. Наличие патологии приводит к тому, что в комплексе ОСА–ВСА имеются два или более местных сопротивления, которые оказывают влияние друг на друга. Поэтому для оценки общих потерь давления в ВСА необходимы дополнительные исследования.

Список использованных источников

1. Особенности диагностики и хирургического лечения атеросклеротических поражений сонных артерий при артериальной гипертензии / Ю. И. Казаков [и др.] // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2008. – № 2. – С. 41–44.

2. Клиническая ангиология: руководство / под ред. А. В. Покровского. – М.: Медицина, 2004. – Т. 1. – 808 с.

3. Особенности кислородного обеспечения головного мозга при атеросклерозе брахиоцефальных артерий в сочетании с их патологической извитостью / Е. Н. Левичева [и др.] // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2011. – № 2. – С. 32–36.

4. Верещагин, Н. В. Роль перегибов внутренних сонных и позвоночных артерий в возникновении тромбозов мозговых сосудов / Н. В. Верещагин, Г. Я. Левина, В. Г. Степанова // Архив патол. – 1972. – № 6. – С. 28–33.

5. Патологическая анатомия нарушений мозгового кровообращения / А. Н. Колтовер [и др.]. – М., 1975. – 320 с.

6. Kinking of the internal carotid artery, its relation to cerebrovascular disease / H. Metz [et al.] // Lancet. – 1961. – Vol. 1. – P. 424–426.

7. Weibel, J. Tortuosity, coiling and kinking of the internal carotid artery. I. Etiology and radiographic anatomy / J. Weibel, W. S. Fields // Neurology. – 1965. – Vol. 15 – P. 7–18.

8. Ottesen, J. T. Applied mathematical models in human physiology / J. T. Ottesen, M. S. Olufsen, J. K. Larsen. – Philadelphie: SIAM, 2004. – 153 p.

9. Неверов, С. Л. Математическая модель бифуркации сосуда в LabView / С. Л. Неверов // Матем. моделирование в клин. физиол. кровообращения. – 2008. – № 3. – С. 65–70.

10. Гемодинамика и механическое поведение бифуркации сонной артерии с патологической извитостью / О. Е. Павлова [и др.] // Известия Саратов. ун-та. Сер. Математика, механика, информатика. – 2010. – Т. 10, № 2. – С. 66–73.

11. Лелюк, В. Г. Ультразвуковая ангиология / В. Г. Лелюк, С. Э. Лелюк. – М.: Реал Тайм, 2007. – 416 с.

12. Механика кровообращения / К. Каро [и др.]. – М.: Мир, 1976. – 415 с.

13. Идельчик, И. Е. Справочник по гидравлическим сопротивлениям / И. Е. Идельчик. – М.: Машиностроение, 1975. – 559 с.

14. Справочник по гидравлическим расчетам / под ред. П. Г. Киселева. – М.: Энергия, 1974. – 313 с.

15. Шумилина, М. В. Комплексная ультразвуковая диагностика патологии периферических сосудов / М. В. Шумилина. – М.: НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2007. – 310 с.

16. Гайшун, Е. И. Математическое моделирование потери давления при патологической извитости внутренней сонной артерии / Е. И. Гайшун, И. В. Гайшун // Вес. НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2016. – № 1. – С. 17–24.

References

1. Kazakov Yu. I., Yavorskaya O. V., Federyakin D. V. “Features of diagnostics, surgical treatment of atherosclerotic damages of carotids at arterial hypertension”, *Cardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya* [Cardiology and Cardiovascular Surgery], 2008, no. 2, pp. 41–44.

2. Pokrovskii A. V. (ed.). *Klinicheskaya angiologiya: rukovodstvo* [Clinical angiology: practice guideline], Medicine, Moscow, Russia, 2004, vol. 1.

3. Levicheva E. N., Karpenko A. A., Kamenskaya O. V., Starodubtsev V. B., Loginova I. Yu. "Features of brain oxygen provision at atherosclerosis of brachiocephalic arteries in combination with their pathological tortuosity", *Cardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya* [Cardiology and Cardiovascular Surgery], 2011, no. 2, pp. 32–36.

4. Vereshchagin N. V., Levina G. Ya., Stepanova V. G. "Role of bends of internal carotid and vertebral arteries during the occurrence of thrombosis of cerebral vessels", *Arkhiv patologii* [Archives of Pathology], 1972, no. 6, pp. 28–33.

5. Koltover A. N., Lyudkovskaya I. G., Vereshchagin N. V., Morgunov V. A. *Patologicheskaya anatomiya narushenii mozgovogo krovoobrashcheniya* [Pathological anatomy of cerebrovascular accident], Meditsina, Moscow, Russia, 1975.

6. Metz H., Baunister R., Murray-Leslie R. "Kinking of the internal carotid artery, its relation to cerebrovascular disease", *Lancet*, 1961, vol. 1, pp. 424–426.

7. Weibel J., Fields W. S. "Tortuosity, coiling, kinking of the internal carotid artery. I. Etiology, radiographic anatomy", *Neurology*, 1965, vol. 15, pp. 7–18.

8. Ottesen J. T., Olufsen M. S., Larsen J. K. "Applied mathematical models in human physiology", SIAM, Philadelphie, USA, 2004.

9. Neverov S. L. "Mathematical model of bifurcation of the vessel in LabView", *Klinicheskaya Fiziologiya Krovoobrashcheniya* [Mathematical Modeling in Clinical Physiology of Blood Circulation], 2008, no. 3, pp. 65–69.

10. Pavlova O. E., Ivanov D. V., Gramakova A. A., Morozov K. M., Suslov I. I. "Hemodynamics and mechanical behavior of the carotid bifurcation with pathological kinking", *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Matematika, mekhanika, informatika* [Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Mathematics. Mechanics. Informatics], 2010, vol. 10, no. 2, pp. 66–73.

11. Lelyuk V. G., Lelyuk S. E. *Ul'trazvukovaya angiologiya* [Ultrasonic angiology], Real Taim, Moscow, Russia, 2007.

12. Karo K., Pedli T., Shroter R., Sid U. *Mekhanika krovoobrashcheniya* [Mechanics of blood circulation], Mir, Moscow, Russia, 1976.

13. Idel'chik I. E. *Spravochnik po gidravlicheskim soprotivleniyam* [Reference book on hydraulic resistance], Mashinostroenie, Moscow, Russia, 1975.

14. Kiseleva P. G. *Spravochnik po gidravlicheskim raschetam* [Handbook on hydraulic calculations], Energiya, Moscow, Russia, 1974.

15. Shumilina M. V. *Kompleksnaya ul'trazvukovaya diagnostika patologii perifericheskikh sosudov* [Complex ultrasonic diagnosis of the pathology of peripheral vessels], NC SSX im. Bakuleva A. N., Moscow, Russia, 2007.

16. Gaishun E. I., Gaishun I. V. "Mathematical modeling of pressure loss at the pathological tortuosity of the inner carotid artery", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2016, no. 1, pp. 17–24.

Информация об авторах

Гайшун Елена Ивановна – канд. мед. наук, заведующий отделением. 1-я городская клиническая больница (пр. Независимости, 64, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gaishun-elena@mail.ru

Гайшун Иван Васильевич – академик, директор Института математики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 11, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gaishun@im.bas-net.by

Information about the authors

Gaishun Elena Ivanovna – Ph. D. (Med.), manager of office. 1th City Hospital (64, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: *gaishun-elena@mail.ru*

Gaishun Ivan Vasil'evich – Academician, director of Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus (11, Surganov Str., Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail:*gaishun@im.bas-net.by*

Для цитирования

Гайшун, Е. И. Потери давления во внутренней сонной артерии в точке бифуркации в норме и при нарушениях гемодинамики / Е. И. Гайшун, И. В. Гайшун // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 54–59.

For citation

Gaishun E. I., Gaishun I. V. "Losses of pressure in the internal carotid artery in the point of the bifurcation at normal and at disturbances of the hemodynamics". *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 54–59.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616.127

Поступила в редакцию 19.09.2016
Received 19.09.2016

И. А. Деревянко[1], С. А. Новаковская[1], И. В. Кузнецова[2]

[1]Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Национальный центр клинической морфологической диагностики, Санкт-Петербург, Российская Федерация

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

С применением экспериментальных моделей стрептозотоцин-индуцированного диабета изучены структурные и ультраструктурные особенности миокарда. Выявлено, что ранняя стадия диабетического поражения сердца носит адаптивный (компенсаторный) характер, а более поздняя его стадия сопровождается развитием миокардиодистрофических процессов и срывом адаптации – декомпенсацией.

Ключевые слова: стрептозотоцин-индуцированный диабет, диабетическая микроангиопатия, диабетическая кардиомиопатия, ультраструктура.

I. A. Derevyanko[1], S. A. Novakovskaya[1], I. V. Kuznetsova[2]

[1]Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]National Center of Clinical Morphological Diagnosis, St. Petersburg, Russian Federation

HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL STATE OF THE MYOCARDIUM IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL DIABETES

Structural and ultrastructural features of the myocardium were studied by experimental models of streptozotocin-induced diabetes. It was revealed that the early stage of the diabetic heart disease is associated with the development of adaptive (compensatory) processes in the heart. The later stages of the diabetic heart disease is associated with the development of degenerative processes of the myocardium and the disruption of adaptation – decompensation.

Keywords: streptozotocin-induced diabetes, diabetic microangiopathy, diabetic cardiomyopathy, ultrastructure.

Введение. Наиболее частой причиной инвалидности и смертности наряду с ишемической болезнью сердца и онкологическими заболеваниями является сахарный диабет (СД) [1]. Основной причиной смерти больных СД являются заболевания сердечно-сосудистой системы [2–4]. Кроме ускоренного развития атеросклероза, обусловливающего высокий уровень летальности при СД, доказано влияние еще одного мощного фактора, ухудшающего прогноз у этих пациентов, – диабетической кардиопатии [5, 6]. В развитии последней большую роль играет не только ухудшение кровоснабжения миокарда, обусловленное микро- и макроангиопатиями, но и специфическое состояние кардиомиоцитов (КМЦ), связанное с особенностями метаболизма в условиях гипоксии и дефицита инсулина.

Цель настоящего исследования – изучение морфологического состояния миокарда, включая его ультраструктурную организацию, в динамике экспериментального сахарного диабета.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на белых половозрелых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном обращении с животными. Крысы были разделены на три группы: контроль (n = 6), экспериментальная группа с СД3 (n = 10) и экспериментальная группа с СД5 (n = 10). Все животные содержались в условиях вивария на стандартном пищевом рационе, имели свободный доступ к воде. СД индуцировали путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина (Sigma, США) в дозе 60 мг/кг, разведенного 0,01 моль/л цитратным буфером (pH 4,5). Верификацию СД осуществляли по увеличению концентрации глюкозы в крови крыс, снижению массы тела, развитию полиурии и полидипсии. Животных под эфирным наркозом выводили из

© Деревянко И. А., Новаковская С. А., Кузнецова И. В., 2017

эксперимента через 3 недели после введения стрептозотоцина (группа СД3) и через 5 недель (группа СД5).

Для морфологического исследования сердца на светооптическом уровне у животных иссекали миокард левого желудочка (ЛЖ) во время аутопсии. Образцы миокарда фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина в течение 48 ч, промывали в проточной воде, а далее производили обработку материала и заливку его в парафин по общепринятой методике. Парафиновые срезы толщиной 3–5 мкм, полученные при помощи ротационного микротома CUT 5062 (SLEE medical, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону и изучали в световом микроскопе Optec BK 5000 с цифровой камерой (Optec, Китай).

Параллельно из тех же участков миокарда производили забор материала для электронной микроскопии. Образцы сердечной мышцы фиксировали сначала в 2,5 %-ном растворе глутарового альдегида, а затем в 2 %-ном растворе четырехокиси осмия. В дальнейшем ткань обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, пропитывали в смеси эпоксидных смол и заключали в блоки по стандартной методике. Полимеризацию блоков проводили в термостате при 37 °С в течение 2 сут и при 56 °С еще 4 сут. Из полученных блоков на ультрамикротоме LKB (Швеция) изготавливали ультратонкие срезы, которые монтировали на сеточки и после контрастирования их цитратом свинца изучали под электронным микроскопом JEM-100B (Япония).

Результаты и их обсуждение. При исследовании миокарда ЛЖ животных группы СД3 на светооптическом уровне выявлена незначительная разобщенность в расположении пучков мышечных волокон, обусловленная слабо выраженным интерстициальным отеком. Более выраженными в миокарде крыс были сосудистые нарушения. Независимо от диаметра кровеносных сосудов наблюдались явления нарушения перфузии органа: периваскулярный отек, венозное полнокровие, запустевание и спазм артериол и мелких артерий. Нередко в капиллярах отмечались явления стаза эритроцитов, в отдельных артериолах и мелких артериях наблюдалось выбухание ядер эндотелиальных клеток внутрь просвета сосудов. Стенки многих из них были неравномерно утолщены в результате гипертрофии гладкомышечных клеток, что снижало их пропускную способность и уровень трофики миокарда.

При электронно-микроскопическом исследовании КМЦ животных группы СД3 отмечалось упорядоченное расположение миофибрилл с правильной поперечной исчерченностью и относительно плотной упаковкой миофиламентов. Ядра большинства КМЦ сохраняли свою целостность и имели характерные неглубокие инвагинации кариолеммы.

В КМЦ определялось большое количество отечных митохондрий разных размеров и формы, с просветленным митохондриальным матриксом, сглаженными и фрагментированными кристами, истонченным межмембранным пространством. Следует отметить, что в большинстве случаев митохондрии в межфибриллярной зоне тесно контактировали друг с другом, располагаясь цепочкой в 2–3 ряда и более, а в околоядерной зоне – беспорядочной массой у полюсов ядра. Сохранение гетерогенности ультраструктуры и популяции митохондрий может быть проявлением эндогенных механизмов выживания клетки при длительной гипоксии миокарда [7].

Предполагается, что в условиях хронической гипоксии запускаются два разнонаправленных процесса: выбраковка митохондрий с нарушенной функциональной активностью и образование новых митохондрий с целью сохранения части органелл в условиях тяжелого стрессорного воздействия [7, 8]. Выявленные у крыс группы СД3 изменения в структуре митохондрий свидетельствуют о запуске подобных процессов на начальных стадиях диабетического поражения сердца. А поскольку количество «нормальных» митохондрий превалировало над патологически измененными, можно предположить, что на ранней стадии диабетического поражения сердца процесс образования новых митохондрий идет интенсивнее, нежели выбраковка митохондрий с нарушенной функциональной активностью, и, следовательно, раннюю стадию диабетической кардиомиопатии можно рассматривать как стадию компенсации (адаптации) в ответ на возрастающее кислородное голодание сердечной мышцы.

Ультраструктурная организация сосудов миокарда животных группы СД3 характеризовалась различными структурно-функциональными нарушениями эндотелия микрососудов – изменением их архитектоники (формы и размера), дисфункцией эндотелия, изменением адгезив-

ных свойств эндотелиальных клеток, явлениями клазматоза микроворсинок эндотелиальных клеток и перикапиллярным отеком. Эндотелиальные клетки чаще всего были гипертрофированы, а их ядра занимали большую часть просвета сосуда. Хроматин гипертрофированных эндотелиоцитов представлен в виде диффузно рассеянных гранул эухроматина и конденсированных гранул гетерохроматина, расположенных главным образом вдоль внутренней ядерной мембраны. Особенностью сосудов миокарда экспериментальных животных являлось значительное сужение их просвета и необычные очертания рельефа. В нескольких местах стенка образовывала разнообразные по форме и глубине дивертикулы в виде каналов, карманов, завитков и др. с едва заметными просветами.

При исследовании миокарда ЛЖ животных группы СД5 на светооптическом уровне с окраской срезов гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону выявлены КМЦ с литическими изменениями. Морфологическими эквивалентами литических повреждений цитоплазмы КМЦ на светооптическом уровне были нарушение компактной упаковки и разрежение миофибрилл, выраженное просветление цитоплазмы, образование очагов «опустошения» преимущественно вблизи ядер. При этом межклеточное пространство было незначительно расширено за счет тонких прослоек интерстициальной ткани и слабо выраженного интерстициального отека. В отдельных случаях выявлены фокусы некробиоза ядер КМЦ с характерным для данного процесса признаком кариопикноза ядер.

Во многих КМЦ определялись небольшие липидные капли, рассеянные по саркоплазме, а в отдельных случаях – истинные адипоциты и в строме миокарда, что свидетельствует о начале развития жировой дистрофии миокарда. Основной причиной развития подобных изменений миокарда чаще всего являются гипоксия и метаболические нарушения, связанные с гипергликемией и дефицитом инсулина, что в конечном итоге приводит к нарушению метаболизма жиров в клетках и к разрушению липопротеинов внутриклеточных структур КМЦ.

Характерной морфологической особенностью миокарда животных группы СД5 являлся периваскулярный фиброз, который затрагивал сосуды разного диаметра и калибра. Существенным изменениям подвергались также сосуды микроциркуляторного русла миокарда. Вены и венулы были расширены, заполнены форменными элементами крови. Нередко отмечались явления стаза эритроцитов в капиллярах. Особо следует отметить характерное для данной стадии выбухание и/или слущивание эндотелиоцитов как в капиллярах, так и в более крупных сосудах. Артерии и артериолы в большинстве случаев находились в состоянии спазма, а их мышечный слой был утолщен, что является проявлением вазоконстрикции, которая может быть обусловлена гипертонусом прессорного отдела сосудодвигательного центра головного мозга. Нейрогенное сужение сосудов осуществляется за счет возбуждения адренергических волокон, которые действуют на гладкие мышцы сосудов путем высвобождения адреналина в области нервных окончаний. Постоянное возбуждение прессорного отдела поддерживается импульсами от хеморецепторов сосудистых рефлексогенных зон (аортальной и синокаротидной). Раздражителями для хеморецепторов являются увеличение концентрации CO_2, уменьшение pH и снижение концентрации O_2 в артериальной крови. Таким образом, формирование «порочного круга» на поздних стадиях диабетического поражения сердца, срыв адаптации – декомпенсация сопровождаются развитием и прогрессированием жировой дистрофии, активизацией фибробластов и развитием склеротических изменений.

При электронно-микроскопическом исследовании миокарда животных группы СД5 отмечались нарушение структурной организации миофибрилл и полиморфизм ультраструктур миокардиальных клеток. Ядра чаще всего имели округлую или оваловидную форму и нередко были гипертрофированы, располагались в центре миокардиальных клеток, иногда смещались в подсарколеммальную зону (рис. 1, *a*). Обнаружены также ядра неправильной фестончатой формы со множеством инвагинаций и выростов ядерной мембраны и единичные ядра с признаками кариорексиса (рис. 1, *b*, *c*). В диспергированном состоянии ядрышки были смещены к периферии ядра. Отмечалось расширение и опустошение околоядерного пространства, заполненного разреженным цитоплазматическим матриксом (рис. 1, *d*).

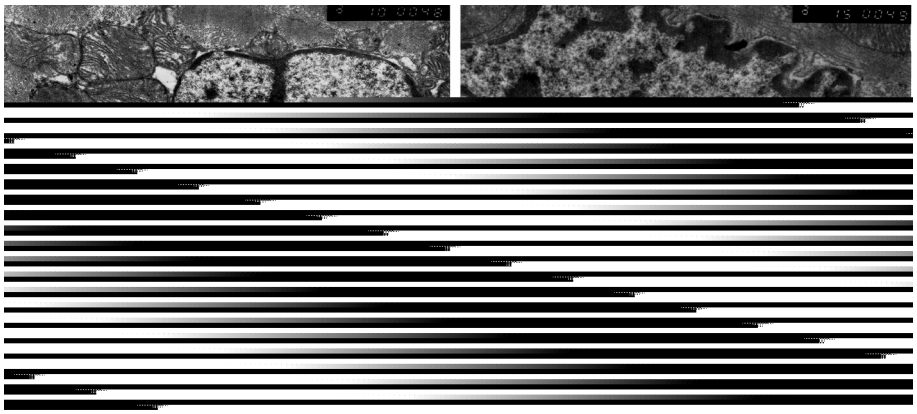


Рис. 1. Структурно-функциональное состояние ядер КМЦ у крыс экспериментальной группы СД5: *a* – овоидное ядро (×10 000), *b* – фестончатое ядро с множеством инвагинаций (×15 000), *c* – ядро с признаками кариорексиса (×15 000), *d* – опустошение и просветление околоядерного пространства (×15 000)

Fig. 1. Structural and functional state of CMC nuclei in rats of the experimental group D5: *a* – ovoid nucleus (× 10 000), *b* – scalloped core with a lot of intussusception (× 15 000), *c* – nucleus with signs karyorhexis (× 15 000), *d* – devastation and enlightenment perinuclear space (× 15 000)

В некоторых КМЦ имелись признаки повреждения сократительного аппарата в виде мелкоочагового лизиса миофибриллярных пучков, «таяния» миофибрилл и их разрыва.

Отмечался полиморфизм митохондрий КМЦ. Выявлялись митохондрии с дегенеративными и деструктивными изменениями. Наиболее частыми дегенеративными изменениями митохондрий были набухание органелл, просветление и гомогенизация митохондриального матрикса, разрушение, фрагментация крист, вплоть до полной их редукции.

Отличительными особенностями миокарда крыс группы СД5, выявленными при электронно-микроскопическом исследовании, были деструкция митохондрий подсарколеммальной зоны и извитость сарколеммы (рис. 2, 3). Деструкция митохондрий сопровождалась разрывом их наружных мембран, что приводило к полному разрушению крист, а в области деструкции органелл наблюдалось формирование миелиноподобных телец.

Отмечалась извитость сарколеммы КМЦ, а кроме того, встречались участки, в которых поперечные Т-трубочки отсутствовали. В норме сарколемма КМЦ на уровне телофрагм (Z-линий) образует глубокие каналообразные впячивания, которые имеют важное функциональное значение, обеспечивая быстрое проведение потенциала действия к каждой миофибрилле. Есть мнение, что причиной разру-

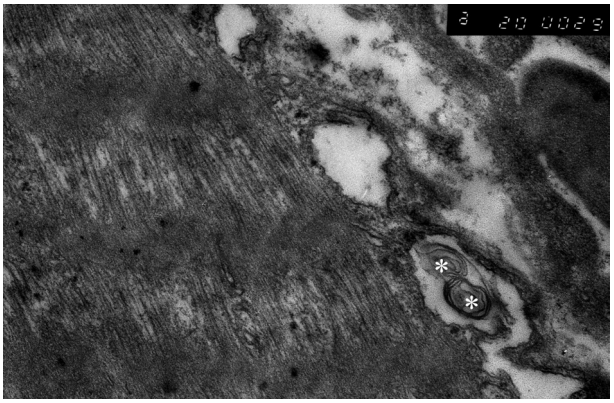


Рис. 2. Деструкция митохондрий подсарколеммальной зоны КМЦ у крыс экспериментальной группы СД5: разрыв наружных мембран митохондрий, полное разрушение крист, формирование миелиноподобных телец (указано звездочками). ×20 000

Fig. 2. The destruction of the mitochondria podsarkolemmalnoy area of CMC in rats of the experimental group D5: rupture of the outer membranes of mitochondria, the complete destruction of the cristae, and the formation of myelin cells (indicated by asterisks). ×20 000

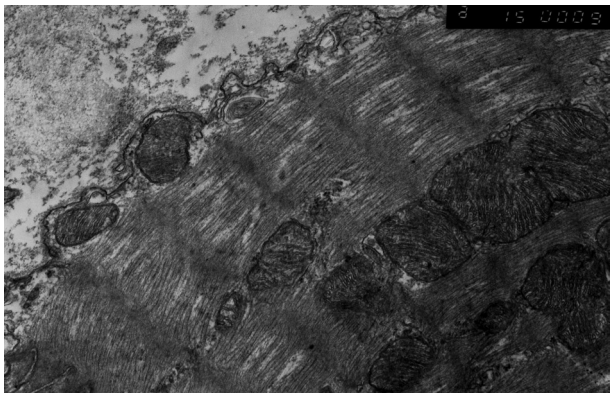


Рис. 3. Извитость сарколеммы КМЦ у крыс экспериментальной группы СД5, отсутствие Т-трубочек в районе телофрагм. ×15 000

Fig. 3. Curl sarcolemma of CMC in rats of the experimental group D5, the absence of T-tubules in telofragm area. × 15 000

шения структур КМЦ, нарушения структуры сарколеммы, изменения ионного равновесия и снижения активности актомиозинового комплекса КМЦ является прямая глюкозотоксичность [6].

При электронно-микроскопическом исследовании микроциркуляторного звена сосудистого русла миокарда ЛЖ крыс группы СД5 отмечались гипертрофия и выбухание ядер эндотелиоцитов в просвет сосуда, вплоть до полной обструкции его просвета. Ядра многих эндотелиальных клеток имели неправильную форму и глубокие инвагинации. Хроматин концентрировался преимущественно вдоль ядерной оболочки. Во многих сосудах микроциркуляторного русла отмечались складчатость люминальной поверхности эндотелиальных клеток и выраженная извитость сосудистой стенки с редукцией просвета сосудов, утолщение базальной мембраны и признаки снижения пропускной способности капилляров. Снижение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме эндотелиоцитов свидетельствовало о подавлении транспортной функции последних.

В миокарде экспериментальных животных группы СД5 выявлены также признаки расстройства кровообращения в виде агрегации, сладжирования и агглютинации форменных элементов крови (эритроцитов) и их адгезии к эндотелиоцитам, периваскулярный отек.

Выводы

1. Ранняя стадия диабетической кардиомиопатии представляет собой стадию компенсации (адаптации) в ответ на возрастающее кислородное голодание сердечной мышцы.

2. Поздние стадии развития диабетической кардиомиопатии сопровождаются развитием миокардиодистрофических процессов, которые проявляются в литическом повреждении КМЦ, развитии фиброза и жировой дистрофии.

3. Нарушение ультраструктурной организации миокарда на более поздних стадиях диабетического поражения сердца сопровождается дегенеративными и деструктивными повреждениями митохондрий.

4. Деструкция митохондрий подсарколеммальной зоны и извитость сарколеммы свидетельствуют о прямом токсическом действии гипергликемии на КМЦ.

5. Наличие ультраструктурных признаков повреждения сократительного аппарата КМЦ – мелкоочагового лизиса, разрыва и «таяния» миофибрилл, наблюдаемых преимущественно на периферии КМЦ и вблизи капилляров, свидетельствует о глюкозотоксичности, развивающейся после введения стрептозотоцина.

Список использованных источников

1. Influence of diabetes mellitus on heart failure risk and outcome / C. Bauters [et al.] // Cardiovasc. Diabetol. – 2003. – Vol. 2, N 1. – P. 16.

2. Сосудистые осложнения у больных сахарным диабетом (альтернативные методы диагностики и лечения) / Р. М. Заславская [и др.]. – М., 2006. – С. 34–36.

3. Дедов, И. И. Диабет как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний / И. И. Дедов // Сердечная недостаточность. – 2003. – № 1. – С. 12–15.

4. Bartni, R. M. Managing heart disease diabetes and heart: compromised myocardial function – a common challenge / R. M. Bartni, K. Malmberg, L. Ryden // Eur. Heart J. – 2003. – Vol. 5. – P. 33–41.

5. Melchior, T. M. Coronary atherosclerosis or diabetic cardiomyopathy? Pathoanatomic changes of blood vessels, nerves and myocardium in patiens with diabetes mellitus / T. M. Melchior, M. B. Seibaek, A. Sajadien // Ugeskr Laeger. – 1998. – Vol. 160, N 9. – P. 1307–1311.

6. Обрезан, А. Г. Структура сердечно-сосудистых заболеваний у больных сахарным диабетом II типа, диабетическая кардиомиопатия как особое состояние миокарда / А. Г. Обрезан, Р. М. Бицадзе // Вестн. СПб. ун-та. – 2008. – Вып. 2. – С. 47–52.

7. Александров, А. А. Диабетическое сердце: схватка за митохондрии / А. А. Александров // Consilium medicum. – 2003. – Т. 5, № 9. – С. 509–513.

8. Сапрунова, В. Б. Выявление цитохром *с* оксидазной активности в митохондриях кардиомиоцитов изолированной ткани миокарда при длительном действии гипоксии / В. Б. Сапрунова, И. М. Солодовникова, Л. Е. Бакеева // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 3. – С. 268–274.

References

1. Bauters C., Lamblin N., Mc Fadden E. P., Van Belle E., Millaire A., de Groote P. “Influence of diabetes mellitus on heart failure risk, outcome”, *Cardiovascular Diabetology*, 2003, vol. 2, no. 1, p. 16.

2. Zaslavskaya R. M., Tulemisov E. U., Smirnova L. V., Aitmagambetova B. A. *Sosudistye oslozhneniya u bolnykh sakharnym diabetom (al’ternativnye metody diagnostiki i lecheniya)* [Vascular complications in patients with diabetes (alternative methods of diagnosis and medical treatment)], Moscow, RU, 2006.

3. Dedov I. I. “Diabetes as a risk factor of cardiovascular diseases”, *Serdechnaya nedostatochnost’* [Russian Heart Failure Journal], 2003, no. 1, pp. 12–15.

4. Bartni R. M., Malmberg K., Ryden L. “Managing heart disease diabetes, heart: compromised myocardial function – a common challenge”, *European Heart Journal*, 2003, vol. 5, pp. 33–41.

5. Melchior T. M., Seibaek M. B., Sajadien A. “Coronary atherosclerosis or diabetic cardiomyopathy? Pathoanatomic changes of blood vessels, nerves, myocardium in patiens with diabetes mellitus”, *Ugeskr Laeger*, 1998, vol. 160, no. 9, pp. 1307–1311.

6. Obrezan A. G., Bitsadze R. M. “Structure of cardiovascular diseases in patients with II type diabetes, diabetic cardiomyopathy as a particular state of the myocardium”, *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta, Seriya 11: Meditsina* [Vestnik of Saint Petersburg University. Medicine], 2008, no. 2, pp. 47–52.

7. Aleksandrov A. A. “Diabetic heart: fight for mithochondria”, *Consilium medicum*, 2003, vol. 5. no. 9, pp. 509–513.

8. Saprunova V. B., Solodovnikova I. M., Bakeeva L. E. “Identification of cytochromes with oxidase activity in mitochondria of cardiocytes of the myocardium tissue during long hypoxia”, *Tsitologiya* [Cytology], 2008, vol. 50, no. 3, pp. 268–274.

Информация об авторах

Деревянко Ирина Александровна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina.derewianko@yandex.by

Новаковская Светлана Алексеевна – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: novakovskaya@tut.by

Кузнецова Ирина Владимировна – канд. мед. наук, врач-патологоанатом. Национальный центр клинической морфологической диагностики (ул. Олеко Дундича, д. 8, корп. 2, лит. А, пом. 6Н, 192283, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация). E-mail: k.iriniya.v@mail.ru

Information about the authors

Derevyanko Irina Alexandrovna – Postgraduate student, Junior scientific researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina.derewianko@yandex.by

Novakovskaya Svetlana Alekseevna – Ph. D. (Med.), Lead researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina.derewianko@yandex.by

Kuznetsova Irina Vladimirovna – Ph. D. (Med.), pathologist doctor. National Center of Clinical Morphological Diagnosis” (8, Oleko Dundycha Str., Bldg. 2, lett. A, pom. 6H, 192283, St. Petersburg, Russian Federation). E-mail: k.iriniya.v@mail.ru

Для цитирования

Деревянко, И. А. Гистологические и ультраструктурные изменения миокарда в динамике экспериментального сахарного диабета / И. А. Деревянко, С. А. Новаковская, И. В. Кузнецова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 60–65.

For citation

Derevyanko I. A., Novakovskaya S. A., Kuznetsova I. V. “Histological and ultrastructural state of the myocardium in the dynamics of experimental diabetes”. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 60–65.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616.33-006.6-089:575.191(476)

Поступила в редакцию 27.09.2016
Received 27.09.2016

М. Ю. Ревтович[1], А. И. Шмак[1], О. В. Красько[2], Р. М. Смолякова[1], А. С. Бабенко[1]

[1]Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь
[2]Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНА *REPRIMO* У ПАЦИЕНТОВ С РЕЗЕКТАБЕЛЬНЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Статус метилирования гена *Reprimo* определен в первичной опухоли и в смывах с брюшины до и после лимфодиссекции при радикальном хирургическом лечении рака желудка. Анализ статуса *Reprimo* в смывах у пациентов до и после лимфодиссекции показал статистически значимые его изменения (p = 0,007) и продемонстрировал сопряженность этого статуса в первичной опухоли со степенью метастатического поражения регионарного лимфоколлектора pN (p = 0,043). С помощью многофакторного анализа определены также риски диссеминации, прогрессирования и выживаемости, связанные со статусом *Reprimo* в опухоли, смывах после операции и степенью метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN). Полученные данные позволяют рассматривать положительный статус метилирования *Reprimo* в качестве дополнительного критерия при определении показаний для проведения адъювантной химиотерапии.

Ключевые слова: рак желудка, статус метилирования гена *Reprimo*, перитонеальная диссеминация.

M. Yu. Reutovich[1], A. I. Shmak[1], O. V. Krasko[2], R. M. Smolyakova[1], A. S. Babenko[1]

[1]N. N. Alexandrov National Cancer Centre, Minsk, Republic of Belarus
[2]United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

PROGNOSTIC VALUE OF *REPRIMO* METHYLATION IN PATIENTS WITH RESECTABLE GASTRIC CANCER

The *Reprimo* gene methylation status is identified in primary tumors and peritoneal washings after radical surgical treatment of gastric cancer. The analysis allowed us to show a statistically significant change in the *Reprimo* status in peritoneal washings in patients before and after dissection (p = 0.007) and also to identify the conjugation of the *Reprimo* status in the primary tumor with the number of the metastatic lymph node pN (p = 0.043). The risk of disease progression with peritoneal dissemination and survival linked with the *Reprimo* tumor status, with the *Reprimo* status of peritoneal washings, and with lymph node metastases (pN) are identified using the multivariate analysis. The data allow us to consider the methylation status *Reprimo* as an additional indication for adjuvant intraperitoneal chemotherapy.

Keywords: gastric cancer, *Reprimo* gene methylation status, peritoneal dissemination.

Введение. Отдаленные результаты радикального хирургического лечения пациентов, страдающих раком желудка, зависят не только от стадии опухолевого процесса, определяемой согласно классификации TNM, но и от молекулярно-генетических особенностей аденокарциномы желудка, обусловливающих ее инвазивный и метастатический потенциал. Последнее является, на наш взгляд, основным в развитии прогрессирования заболевания, несмотря на радикальный характер проведенного лечения. В этой связи представляется актуальной оценка уровня экспрессии различных генов, ответственных за опухолевую прогрессию. Согласно данным литературы, характерным для опухолевой ткани является метилирование промоторного участка некоторых генов, что сопровождается усилением метастатического и инвазивного потенциала злокачественных опухолей [1, 2]. Одним из таких генов является *Reprimo* (RPRM, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate) – белок-регулятор клеточного цикла. Метилирование промоторного участка данного гена, которое с высокой частотой выявляется в образцах первичных опухолей и практически не наблюдается в образцах нормальной ткани, сопровождается снижением экспрессии *Reprimo* [1]. Установлено, что положительный статус метилирования *Reprimo* сопровождается усилением способности злокачественных опухолей к инвазии и метастазированию [2]. Логично предположить, что наличие положительного статуса метилирования *Reprimo* приведет к увеличению метастати-

ческих и инвазивных свойств аденокарциномы желудка в сравнении с ситуациями, когда метилирование промоторного участка в первичной опухоли отсутствует.

Цель исследования – оценить влияние статуса метилирования гена *Reprimo* в первичной опухоли и перитонеальных смывах на отдаленные результаты лечения.

Материалы и методы исследования. В исследование было включено 97 пациентов в возрасте от 24 до 75 лет, страдавших раком желудка и имевших различную степень распространения опухолевого процесса (табл. 1).

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

T a b l e 1. **Characteristics of the patients included in the study**

Степень распространения опухолевого процесса/ медиана наблюдений	К-во пациентов	Характер течения заболевания		
		Прогрессирование заболевания, *n* (%)	Прогрессирование заболевания с формированием диссеминации, *n* (%)	Из них умерли от прогрессирования опухолевого процесса, *n* (%)
pTNM:				
pT4a-bN2-3M0	45	32 (71)	24 (53)	20 (44)
pT4a-bN1M0	12	5 (42)	2 (17)	4 (33)
pT4a-bN0M0	22	7 (32)	4 (18)	4 (18)
pT1-3N0-3M0	18	5 (28)	3 (17)	3 (17)
Всего случаев		49	33	31
Медиана наблюдений, сут:				
у пациентов с зарегистрированным прогрессированием заболевания (цензурированных)		271	245	470
у пациентов со стабилизацией процесса		872	862	862

Всем пациентам выполнено хирургическое вмешательство в объеме стандартной/комбинированной радикальной субтотальной резекции желудка/гастрэктомии в сочетании с лимфодиссекцией D2, включавшей в себя моноблочное удаление клетчатки вместе с лимфатическими узлами, характерными, согласно Japanese Gastric Cancer Association (JGCA, 1998) для I–II этапов метастазирования. Статус метилирования гена *Reprimo* исследован в опухолевой ткани желудка (95 пациентов), а также в смывах с брюшины (86 пациентов) до выполнения мобилизации желудка (сразу после выполнения лапаротомии) и после завершения лимфодиссекции (перед дренированием брюшной полости и началом проведения интраперитонеальной химиотерапии). Одновременная оценка статуса метилирования как в первичной опухоли, так и в перитонеальных смывах оказалась возможной у 82 пациентов.

Оценка статуса метилирования промоторной области гена *Reprimo* выполнена в онкологическом отделении биочиповых технологий (заведующий – А. С. Бабенко) Республиканской молекулярно-генетической лаборатории РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова.

Общую фракцию геномной ДНК выделяли с использованием наборов реагентов (QIAMP DNA Blood Mini Kit № 51106 (Qiagen, США) – для выделения из смывов, QIAMP DNA FFPE Tissue Kit № 56404 (Qiagen, США) – для выделения из парафиновых блоков) согласно протоколу их изготовителя. Степень очистки и концентрацию общей фракции ДНК после выделения оценивали с использованием спектрофотометра Cary 60 UV-VIS (Agilent, США), бисульфитную конверсию – с помощью набора реагентов EpiTect Bisulfite Kit (48) Cat. no. 59104 (Qiagen, США).

Для проведения ПЦР с продуктами бисульфитной конверсии использовали амплификатор CFX-96 (BioRad, США). Режим амплификации: при 95 °С – 5 мин (первичная денатурация); 35 циклов амплификации: при 95 °С – 10 с, при 60 °С – 1 мин; финальная элонгация: при 72 °С – 5 мин. Объем реакционной смеси составил 25 мкл. В состав реакционной смеси входили специфические олигонуклеотидные праймеры: 500 нМ, 50 нг кДНК, 0,2 мМ каждого dNTP, 50 мМ KCl, 25 мМ Трис-HCl, 2 мМ $MgCl_2$ и 1,25 МЕ Taq ДНК-полимеразы (ОДО «Праймтех», Беларусь). При оценке результатов руководствовались указаниями оригинальных исследований [3]. Разделение

продуктов ПЦР после бисульфитной конверсии проводили в 2 %-ном агарозном геле с использованием 1×ТАЕ буферного раствора и камеры PowerPacHV (BioRad, США). Результаты регистрировали с помощью системы гель-документации GelDocXR+ (BioRad, США).

Статистический анализ. Частотные характеристики исследуемых показателей представлены в виде абсолютных и относительных величин. При исследовании таблиц сопряженности исследуемых показателей использовали критерий хи-квадрат, в случае нарушения предположений, лежащих в основе критерия хи-квадрат, – точный критерий Фишера–Фримана–Халтона.

Пропорциональное соотношение показателей статуса метилирования *Reprimo* до и после выполнения лимфодиссекции оценивали на основе точного биноманального критерия с расчетом доверительных интервалов (ДИ) по Клопперу–Пирсону [4], различия в пропорциональном соотношении *Reprimo*+ в смывах до начала операции и после завершения лимфодиссекции – по критерию Мак-Немара.

Анализ влияния статуса метилирования *Reprimo* в биоптатах различной локализации и степени распространенности опухолевого процесса, описываемой категориями T и N, на характер прогрессирования заболевания (выживаемость, свободную от диссеминации, – ВСД; выживаемость, свободную от прогрессирования, – ВСП; канцер-специфическую выживаемость – КСВ) проводили с помощью многофакторной регрессии пропорциональных рисков Кокса. Отношение рисков (ОР) рассчитывали как экспоненциальное преобразование соответствующих коэффициентов регрессии, ДИ для ОР – как экспоненциальное преобразование соответствующих ДИ коэффициентов регрессии.

Все расчеты производили с помощью статистического пакета R [5], версия 3.1.3, с использованием пакетов *survival* [6]. Результаты анализа считали статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение. Из 97 пациентов статус метилирования гена *Reprimo* в первичной опухоли определен у 95 человек, из них положительный (*Reprimo*+) – у 35 (37 %), отрицательный (*Reprimo*–) – у 60 (63 %). Принимая во внимание данные литературы о том, что наиболее частым вариантом прогрессирования рака желудка является диссеминация опухоли по брюшине [7], представляется целесообразной совместная оценка статуса метилирования *Reprimo* в первичной опухоли и в местах наиболее частой локализации отдаленных метастазов, в частности в брюшной полости. В связи с этим нами изучен статус метилирования перитонеальных смывов, исходя из того, что положительный их статус может свидетельствовать о присутствии свободных опухолевых клеток в брюшной полости, поскольку метилирование промоторного участка *Reprimo* больше характерно для опухолевой ткани [1].

Логично предположить что: 1) при наличии *Reprimo*+ первичной опухоли смывы с брюшины будут иметь аналогичный статус метилирования, поскольку в свободной брюшной полости могут присутствовать свободные опухолевые клетки со статусом метилирования, аналогичным первичной опухоли; 2) наличие *Reprimo*+ смывов будет сопровождаться более частым формированием перитонеальной диссеминации, обусловливая неблагоприятный прогноз заболевания, поскольку обнаружение свободных опухолевых клеток в брюшной полости рассматривается в качестве инициального момента при формировании перитонеального канцероматоза. Для проверки данного предположения статус метилирования *Reprimo* определяли в смывах с брюшины сразу после выполнения лапаротомии и сразу по завершении лимфодиссекции.

Исследование смывов с брюшины сразу после выполнения лапаротомии позволило оценить статус метилирования у 86 (88,7 %) из 97 пациентов, из которых *Reprimo*– обнаружен у 62 (72 %) человек, *Reprimo*+ – у 24 (28 %). Сопоставительный анализ статуса метилирования *Reprimo* в первичной опухоли и в смывах с брюшины, выполненный после лапаротомии, показал, что в случае его положительного статуса в первичной опухоли аналогичный статус *Reprimo* в смывах с брюшины определялся у 15 (44 %) пациентов из 41 с аналогичным статусом метилирования *Reprimo* в первичной опухоли. В то же время при отсутствии метилирования гена *Reprimo* в первичной опухоли у 40 пациентов – *Reprimo*+ смывы отмечены только у 6 (15 %). При оценке сопряженности статуса метилирования в первичной опухоли и в смывах установлено, что статус метилирования гена *Reprimo* в первичной опухоли определяет статус метилирования смывов до начала лечения ($p = 0{,}026$) (табл. 2). Объяснением данному факту может быть то, что метилиро-

вание промоторного участка *Reprimo* связано с упомянутым выше снижением экспрессии данного гена, вследствие чего формируется так называемый «агрессивный» фенотип аденокарциномы, обладающей высоким инвазивным и метастатическим потенциалом [8, 9]. Наличие подобного агрессивного фенотипа опухоли обусловливает появление в брюшной полости свободных опухолевых клеток, косвенным подтверждением наличия которых как раз и является положительный статус метилирования перитонеальных смывов, поскольку метилирование промоторной области гена *Reprimo* характерно именно для опухолевой ткани, в частности для аденокарциномы желудка [1]. В пользу данного предположения свидетельствует следующее: а) у пациентов с *Reprimo*+ первичной опухолью массивное поражение метастатического лимфоколлектора, соответствующее pN2-3, отмечалось чаще, чем у пациентов, у которых статус метилирования первичной опухоли был отрицательным (p = 0,043); б) имела место тенденция к большей глубине инвазии стенки желудка (p = 0,061) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. **Оценка сопряженности характеристик первичной опухоли (pTN) и статуса метилирования *Reprimo* в перитонеальных смывах со статусом метилирования *Reprimo* в первичной опухоли**

T a b l e 2. **Evaluation of conjugation of the primary tumor characteristics (pTN) and the *Reprimo* methylation status in peritoneal washings with the *Reprimo* methylation status in the primary tumor**

Анализируемый признак	Статус метилирования гена *Reprimo* в первичной опухоли		p
	Reprimo–, *n* (%)	*Reprimo*+, *n* (%)	
Статус метилирования *Reprimo* в смывах с брюшины до выполнения лимфодиссекции:			
Reprimo–	34 (85)	27 (61)	0,026
Reprimo+	6 (15)	15 (44)	
Статус метилирования *Reprimo* в смывах с брюшины после завершения лимфодиссекции:			
Reprimo–	26 (65)	27 (61)	0,822
Reprimo+	14 (35)	17 (39)	
pT:			
pT1-3	12 (26)	5 (10)	0,061
pT4a-b	34 (74)	44 (90)	
pN:			
pN0-1	28 (61)	18 (37)	0,043
pN2	6 (13)	15 (31)	
pN3	12 (26)	16 (33)	

Исследование смывов с брюшины после завершения лимфодиссекции позволило оценить статус метилирования у 86 (88,7 %) из 97 пациентов. Анализ сопряженности статуса метилирования промоторной области *Reprimo* в первичной опухоли и в смывах с брюшины после завершения лимфодиссекции продемонстрировал отсутствие взаимосвязи между рассматриваемыми показателями (p = 0,822).

Поиск возможной причины данного явления с помощью сопоставительного анализа статуса метилирования *Reprimo* в перитонеальных смывах в начале (после лапаротомии) и в конце операции (после завершения лимфодиссекции) показал его изменение у 30 (35 %) из 86 пациентов (95 % ДИ – 25–46 %, p = 0,007). Изменение статуса метилирования *Reprimo* в смывах выглядело следующим образом:

изменение статуса среди пациентов с *Reprimo*+ смывами до начала лимфодиссекции имело место у 11 (46 %) человек, статус не изменился у 13 пациентов;

среди пациентов с Reprimo– смывами до начала лимфодиссекции у 43 статус метилирования после завершения лимфодиссекции не претерпел изменений, а у 19 пациентов произошло изменение статуса метилирования на положительный.

Нами не отмечено увеличения количества пациентов с *Reprimo*+ смывами после завершения лимфодиссекции (p = 0,201). С одной стороны, возможно, это связано с недостаточной чувствительностью и специфичностью использованного показателя (в частности, этим может быть

объяснено изменение статуса метилирования с положительного на отрицательный в процессе выполнения лимфодиссекции). С другой стороны, статус метилирования лишь косвенно свидетельствует о наличии в свободной брюшной полости свободных опухолевых клеток, поэтому отрицательный статус не исключает их наличия там.

Возможным объяснением изменения установленного нами статуса метилирования промоторного участка рассматриваемого гена в перитонеальных смывах с отрицительного (*Reprimo*–) на положительный (*Reprimo*+) в процессе выполнения операции могло быть распространение опухолевых клеток (имеющих положительный статус метилирования гена *Reprimo*, характерный для опухолевой ткани) из пересеченных лимфатических сосудов и лимфоузлов в процессе выполнения лимфодиссекции в свободную брюшную полость [11], приведшее к увеличению содержания *Reprimo*+ клеток.

С целью проверки данного предположения и установления фактора, повлиявшего на изменение статуса метилирования, проведена оценка сопряженности статуса метилирования *Reprimo* в первичной опухоли и в смывах со степенью метастатического поражения регионарного лимфоколлектора как возможного источника свободных опухолевых клеток в процессе выполнения лимфодиссекции (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. **Оценка сопряженности статуса метилирования *Reprimo* в первичной опухоли и в смывах со степенью метастатического поражения регионарного лимфоколлектора**

T a b l e 3. **Evaluation of conjugation of the *Reprimo* methylation status in the primary tumor and washings with the degree of involvement of the regional lymph node**

Анализируемый признак	Степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора pN			*p*
	pN0-1, *n* (%)	pN2, *n* (%)	pN3, *n* (%)	
Статус метилирования *Reprimo* в опухоли:				
Reprimo–	28 (61)	6 (29)	12 (43)	0,043
Reprimo+	18 (39)	15 (71)	16 (57)	
Статус метилирования *Reprimo* в смывах с брюшины:				
до выполнения лимфодиссекции:				
Reprimo–	30 (75)	14 (78)	18 (64)	0,576
Reprimo+	10 (25)	4 (22)	10 (36)	
после выполнения лимфодиссекции:				
Reprimo–	29 (73)	12 (67)	13 (46)	0,097
Reprimo+	11 (27)	6 (33)	15 (54)	

Как видно из табл. 3, при наличии положительного статуса метилирования *Reprimo* в первичной опухоли статистически значимо чаще встречалось массивное метастатическое поражение регионарного лимфоколлектора pN2-3 ($p = 0{,}043$), что является подтверждением приведенных выше данных о более агрессивном фенотипе аденокарциномы в случае супрессии гена *Reprimo* [8, 9]. Наличие множественных метастазов в регионарных лимфоузлах обусловило тенденцию к увеличению количества *Reprimo*+ смывов у данной категории пациентов ($p = 0{,}097$).

Таким образом, оценка сопряженности статуса метилирования в первичной опухоли и в смывах с брюшины с показателями, характеризующими степень распространенности опухолевого процесса (pT и pN), показала, что статус метилирования гена *Reprimo* в первичной опухоли сопряжен: 1) со статусом метилирования *Reprimo* в перитонеальных смывах до начала операции; 2) со степенью метастатического поражения регионарного лимфоколлектора.

Оценка прогностической значимости факта уменьшения экспрессии гена *Reprimo* в первичной опухоли, обусловленного метилированием промоторного участка этого гена, позволило установить негативное влияние положительного статуса его метилирования на отдаленные результаты лечения, что проявилось статистически значимым снижением показателя выживаемости: КСВ – $p_{\text{log-rank}} < 0{,}001$ (рис. 1, *a*); ВСП – $p_{\text{log-rank}} = 0{,}002$ (рис. 1, *c*). Влияния на ВСД нами не выявлено – $p_{\text{log-rank}} = 0{,}316$ (рис. 1, *b*).

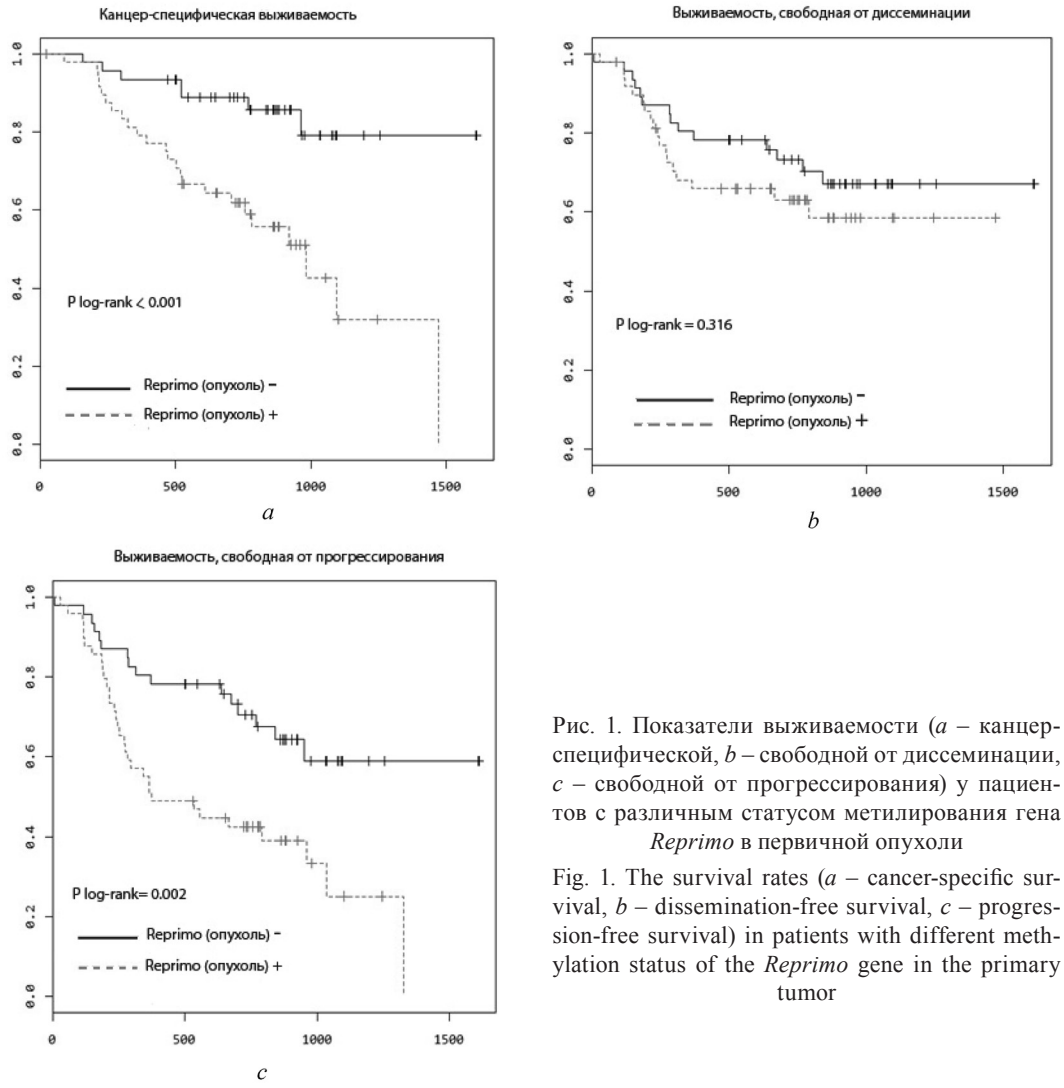


Рис. 1. Показатели выживаемости (*a* – канцер-специфической, *b* – свободной от диссеминации, *c* – свободной от прогрессирования) у пациентов с различным статусом метилирования гена *Reprimo* в первичной опухоли

Fig. 1. The survival rates (*a* – cancer-specific survival, *b* – dissemination-free survival, *c* – progression-free survival) in patients with different methylation status of the *Reprimo* gene in the primary tumor

Факт изменения статуса метилирования *Reprimo* в перитонеальных смывах на положительный, равно как исходно положительный статус метилирования в смывах (*Reprimo*+), оказал негативное влияние на отдаленные результаты лечения. Проведенный однофакторный анализ продемонстрировал статистически значимое ухудшение показателей выживаемости в сравнении с таковыми у пациентов с *Reprimo*– смывами, полученными как до выполнения лимфодиссекции ($p_{\text{log-rank}}$ для КСВ – 0,026 (рис. 2, *a*), для ВСД – 0,041 (рис. 2, *b*), для ВСП – 0,024 (рис. 2, *c*)), так и после ее завершения ($p_{\text{log-rank}}$ для КСВ – 0,047 (рис. 3, *a*), для ВСД – <0,001 (рис. 3, *b*), для ВСП – <0,001 (рис. 3, *c*)).

Принимая во внимание негативное влияние положительного статуса метилирования гена *Reprimo* как в первичной опухоли, так и в перитонеальных смывах на отдаленные результаты лечения, продемонстрированное нами в однофакторном анализе, изучено прогностическое значение каждого из них (а также категории pN как наиболее часто используемой для оценки прогноза рака желудка) в многофакторном анализе на основе регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса (табл. 4).

Результаты многофакторного анализа продемонстрировали следующее.

1. Метилирование промоторного участка гена *Reprimo* в первичной опухоли повышает риск прогрессирования заболевания и способствует развитию отдаленных лимфогематогенных метастазов, а следовательно, увеличивает риск летального исхода, обусловленный прогрессированием опухолевого процесса. Данный вывод согласуется с упомянутыми выше данными литературы

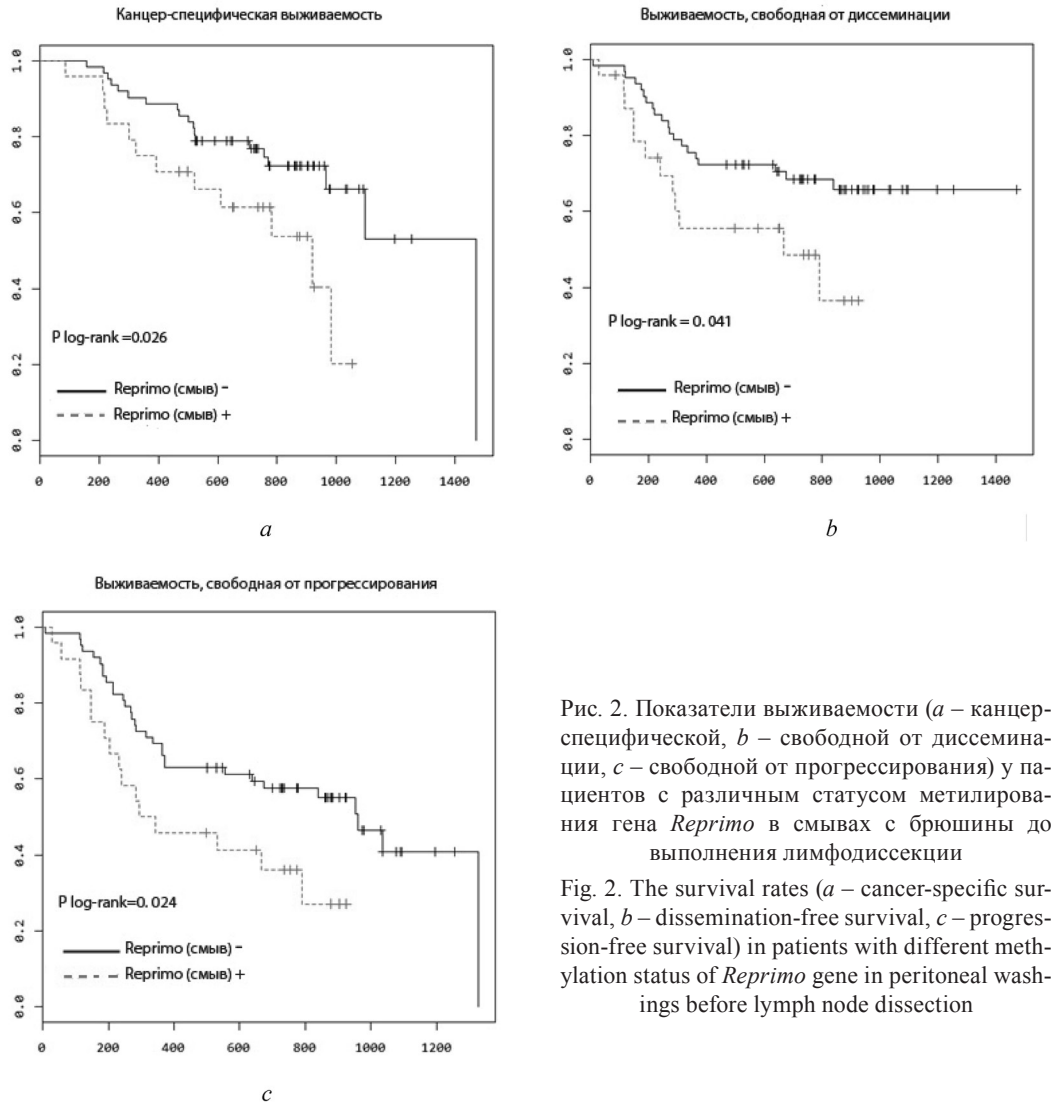


Рис. 2. Показатели выживаемости (*a* – канцер-специфической, *b* – свободной от диссеминации, *c* – свободной от прогрессирования) у пациентов с различным статусом метилирования гена *Reprimo* в смывах с брюшины до выполнения лимфодиссекции

Fig. 2. The survival rates (*a* – cancer-specific survival, *b* – dissemination-free survival, *c* – progression-free survival) in patients with different methylation status of *Reprimo* gene in peritoneal washings before lymph node dissection

о повышении метастатического и инвазивного потенциала опухоли на фоне подавления функции гена *Reprimo*, что приводит к ухудшению показателей выживаемости [8, 9]. Согласно нашим данным, за период наблюдения среди пациентов с отрицательным статусом метилирования *Reprimo* в первичной опухоли от прогрессирования опухолевого процесса умерло 7 (15,2 %) из 46 пациентов, в то время как среди пациентов с положительным статусом метилирования – 24 (49 %) из 49.

2. Положительный статус метилирования гена *Reprimo* в смывах с брюшины после завершения лимфодиссекции позволяет прогнозировать развитие прогрессирования заболевания, в том числе с формированием перитонеальной диссеминации, в отдаленные сроки после радикального хирургического лечения рака желудка. Факт выявления *Reprimo*+ смывов после завершения лимфодиссекции свидетельствует о появлении свободных опухолевых клеток в брюшной полости, что может рассматриваться в качестве инициального момента в развитии прогрессирования заболевания с диссеминацией опухоли по брюшине. Кроме того, наблюдаемое увеличение риска развития других вариантов прогрессирования может свидетельствовать о возможной гематогенной диссеминации опухолевых клеток в процессе выполнения операции. Возможность оценки прогноза заболевания на основании изучения статуса *Reprimo*+ в смывах после завершения лимфодиссекции определяет целесообразность установления статуса данного гена в смывах как обязательного компонента радикального хирургического лечения рака желудка для определения целесообразности проведения адъювантной химиотерапии, включая интраперитонеальную химиотерапию.

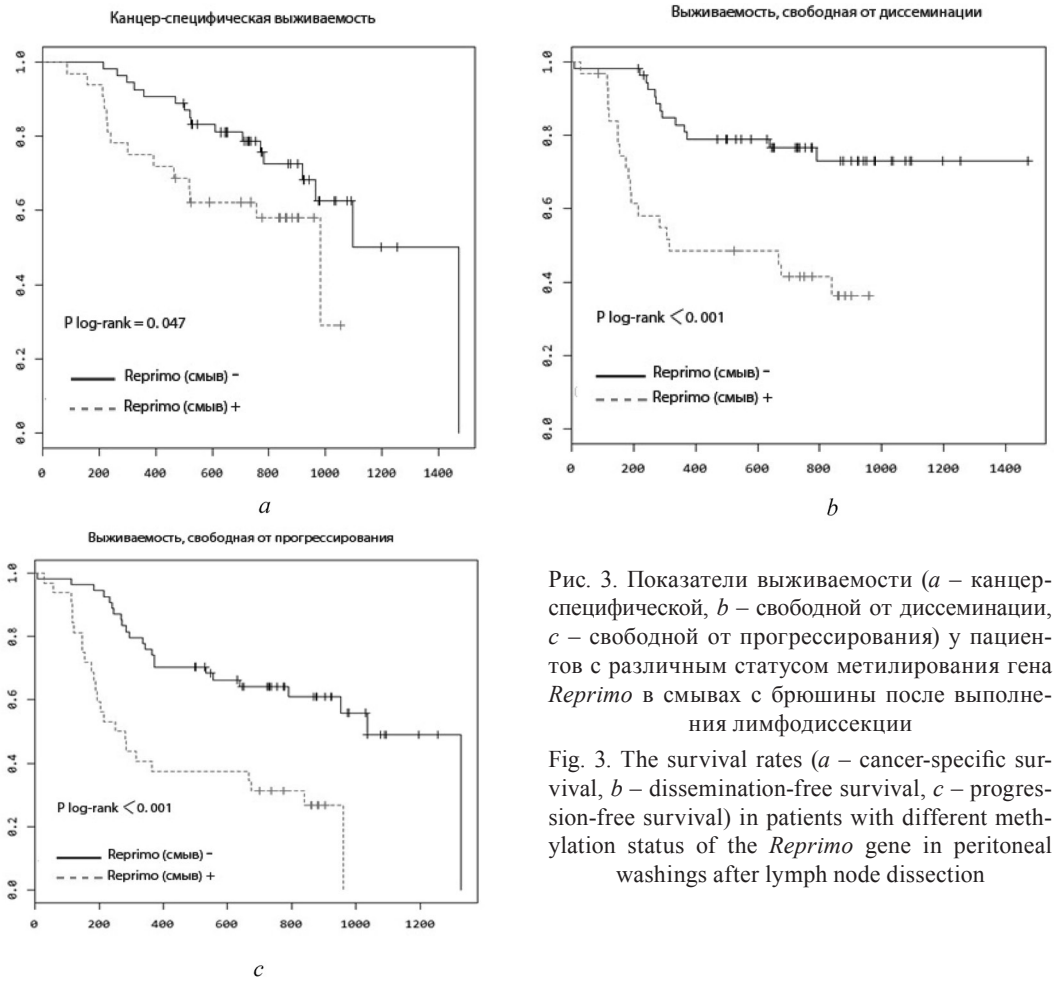


Рис. 3. Показатели выживаемости (*a* – канцер-специфической, *b* – свободной от диссеминации, *c* – свободной от прогрессирования) у пациентов с различным статусом метилирования гена *Reprimo* в смывах с брюшины после выполнения лимфодиссекции

Fig. 3. The survival rates (*a* – cancer-specific survival, *b* – dissemination-free survival, *c* – progression-free survival) in patients with different methylation status of the *Reprimo* gene in peritoneal washings after lymph node dissection

3. Наличие массивного метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN2-3) определяет повышенный риск развития прогрессирования рака желудка в любом его варианте после радикального хирургического лечения (табл. 4), что согласуется с данными литературы, свидетельствующими о негативном влиянии метастатического поражения регионарного лимфоколлектора у пациентов, страдающих раком желудка, на прогноз заболевания [11].

Поскольку, как видно из табл. 2, именно при *Reprimo*+ опухолях чаще встречается метастатическое поражение регионарного лимфоколлектора ($p = 0{,}043$) и наблюдается тенденция к увеличению количества *Reprimo*+ смывов с брюшины после завершения лимфодиссекции ($p = 0{,}097$), именно статус метилирования *Reprimo* в первичной опухоли является определяющим для последующего прогрессирования заболевания. При этом следует учитывать вероятность развития прогрессирования заболевания после радикального хирургического лечения при любой стадии опухолевого процесса, поскольку метастатическое поражение регионарного лимфоколлектора той или иной степени (pN0-1-2-3) может наблюдаться при любой глубине инвазии стенки желудка (pT1-4b). Следовательно, при определении показаний для адъювантного лечения, в частности для интраперитонеальной химиотерапии, основная роль отводится оценке статуса метилирования гена *Reprimo*, а не традиционно используемым для этих целей категориям классификации pTNM. Следует отметить, что применяемый обычно с целью определения показаний для интраперитонеальной химиотерапии критерий инвазии опухолью серозной оболочки желудка (pT4a) не продемонстрировал прогностической значимости в многофакторном анализе.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности: 1) определения статуса метилирования гена *Reprimo* в первичной опухоли до начала лечения (что практически может быть осуществлено на дооперационном этапе во время исследова-

Таблица 4. **Многофакторный анализ риска развития неблагоприятных исходов**
Table 4. **Multivariate analysis of the risk of adverse outcomes**

Показатель	Результаты регрессионного анализа					
	ВСД		ВСП		КСВ	
	β	*p*	β	*p*	β	*p*
Статус метилирования *Reprimo* в опухоли: Reprimo+ против *Reprimo*–	–	–	1,0	**0,003**	1,3	**0,003**
ОР (95 % ДИ)	–		**2,7 (1,4–5,2)**		**3,7 (1,6–8,8)**	
Статус метилирования *Reprimo* после выполнения лимфодиссекции: *Reprimo*+ против *Reprimo*–	1,0	**0,007**	1,1	**<0,001**	–	–
ОР (95 % ДИ)	**2,7 (1,3–5,5)**		**3,0 (1,6–5,5)**		–	
Степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора: pN2 против pN0-1	0,9	0,074	0,5	0,250	0	0,993
ОР (9 5 % ДИ)	2,5 (0,9–6,7)		1,6 (0,7–3,8)		0,9 (0,3–2,8)	
pN3 против pN0-1	1,3	**0,005**	1,4	**<0,001**	1,5	**0,001**
ОР (95 % ДИ)	**3,7 (1,5–9,2)**		**4,0 (1,9–8,5)**		**4,4 (1,8–10,7)**	

ния биоптата, полученного при фиброгастроскопическом исследовании); 2) определения статуса метилирования гена *Reprimo* в смывах с брюшины, полученных после завершения лимфодиссекции. Наличие данной информации необходимо для выделения группы высокого риска прогрессирования заболевания, в том числе с формированием диссеминации опухоли по брюшине в отдаленные сроки после радикальной операции, и решения вопроса для назначения того или иного варианта адъювантного лечения (например, интраперитонеальной химиотерапии).

Согласно литературным данным, метилирование промоторного участка *Reprimo* приводит к снижению его экспрессии, сопровождается увеличением инвазивного и метастатического потенциала аденокарциномы желудка, ухудшая выживаемость пациентов [8]. Результаты нашего исследования, подтверждая изложенное выше, демонстрируют негативное влияние супрессии гена *Reprimo* в первичной опухоли на отдаленные результаты радикального лечения рака желудка. В частности, нами установлено, что для пациентов с *Reprimo*+ первичной опухолью характерно: 1) увеличение риска прогрессирования заболевания и гибели от прогрессирования опухолевого процесса (по результатам многофакторного анализа); 2) увеличение степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора и, как результат, изменение статуса метилирования перитонеальных смывов. Последнее, по нашему мнению, обусловливает появление в брюшной полости после завершения лимфодиссекции свободных опухолевых клеток за счет проникновения последних из пересеченных лимфатических сосудов и/или лимфоузлов. Согласно литературным данным, это является одной из причин прогрессирования заболевания и формирования канцероматоза после радикального хирургического лечения рака желудка [10, 12].

Тот факт, что наличие в брюшной полости свободных опухолевых клеток оказывает негативное влияние на отдаленные результаты лечения радикально оперированных пациентов, страдающих раком желудка, описан в литературе [12]. Наличие свободных опухолевых клеток в перитонеальной жидкости и их неблагоприятное влияние позволило Японской ассоциации по изучению рака желудка (Japanese Gastric Cancer Association) начиная с 1999 г. сделать исследование перитонеальных смывов обязательным компонентом предоперационного обследования пациентов с раком желудка, при этом обнаружение свободных опухолевых клеток позволяет относить данную категорию пациентов к лицам с IV стадией заболевания [13]. Однако наличие свободных опухолевых клеток в брюшной полости до операции встречается относительно нечасто. На наш взгляд, гораздо большую проблему представляют случаи, когда свободные опухолевые клетки появляются в брюшной полости после выполнения радикальной операции, поскольку это может полностью нивелировать лечебный эффект проведенного радикального хирургического лечения.

Результаты нашего исследования продемонстрировали связь между появлением *Reprimo*+ смывов с брюшины после завершения лимфодиссекции D2 у пациентов с массивным метастатическим поражением регионарного лимфоколлектора (pN2-3) и ухудшением показателей выживаемости у пациентов с *Reprimo*+ смывами, полученными после выполнения лимфодиссекции. В отличие от многочисленных публикаций, свидетельствующих о необходимости проведения неоадъювантного лечения в случае обнаружения свободных опухолевых клеток в смывах с брюшины до начала лечения [14], нами не обнаружено влияния статуса метилирования гена *Reprimo* в цитологическом материале смывов, полученном до начала операции, на риск прогрессирования заболевания после проведенного радикального лечения. В то же время после выполнения лимфодиссекции положительный статус метилирования гена *Reprimo* в смывах с брюшины сопровождался ухудшением отдаленных результатов лечения (согласно данным однофакторного анализа) и увеличением риска прогрессирования заболевания с развитием отдаленных лимфогематогенных метастазов и диссеминации опухоли по брюшине (табл. 4). Принимая во внимание, что лимфодиссекция D2 является на сегодняшний день необходимым компонентом радикального хирургического лечения рака желудка, следует минимизировать возможные неблагоприятные ее последствия, такие как повышение риска прогрессирования заболевания вследствие появления и/или увеличения свободных опухолевых клеток в брюшной полости, особенно у пациентов с положительным статусом метилирования *Reprimo* как в первичной опухоли, так и в смывах с брюшины. Данные пациенты представляют, согласно результатам нашего исследования, своего рода группу риска последующего прогрессирования заболевания, что диктует необходимость проведения у них того или иного варианта адъювантного лечения. При этом статус метилирования *Reprimo* как в первичной опухоли, так и в смывах с брюшины после завершения лимфодиссекции является основным при определении показаний для адъювантной интраперитонеальной химиотерапии, в отличие от традиционно применяемых с этой целью, но имеющих в данном случае второстепенное значение, категорий pT и pN классификации pTNM. Изложенное выше позволяет рассматривать положительный статус метилирования *Reprimo* в качестве дополнительного показания для проведения адъювантной химиотерапии (включая интраперитонеальную химиотерапию), помимо традиционно используемого критерия инвазии серозной оболочки желудка.

Выводы

1. Оценка статуса метилирования гена *Reprimo* в первичной опухоли и в смывах с брюшины у пациентов, страдающих раком желудка, может использоваться для прогнозирования отдаленных результатов лечения, включая прогрессирование заболевания с формированием перитонеальной диссеминации.

2. У пациентов с массивным метастатическим поражением регионарного лимфоколлектора выполнение лимфодиссекции в объеме D2 сопровождается увеличением количества *Reprimo*+ смывов, что статистически значимо повышает риск прогрессирования заболевания, формируя перитонеальную диссеминацию в отдаленном периоде после радикальной операции (ОР – 2,7; 95 % ДИ – 1,3–5,5; $p_{Cox} < 0{,}007$). Последнее позволяет рассматривать наличие *Reprimo*+ смывов после завершения лимфодиссекции в качестве дополнительного критерия при отборе пациентов для адъювантного лечения, направленного на профилактику перитонеальной диссеминации.

3. Оценка статуса метилирования в смывах с брюшины, полученных после завершения лимфодиссекции, позволяет расширить показания к проведению интраперитонеальной химиотерапии за счет категории пациентов с *Reprimo*+ смывами после выполнения лимфодиссекции, поскольку последняя увеличивает риск прогрессирования заболевания с диссеминацией опухоли по брюшной полости.

Список использованных источников

1. Aberrant methylation of Reprimo in human malignancies / T. Takahashi [et al.] // Int. J. Cancer. – 2005. – Vol. 115. – P. 503–510.

2. Loss of Expression of Reprimo, a p53-induced Cell Cycle Arrest Gene, Correlates with Invasive Stage of Tumor Progression and p73 Expression in Gastric Cancer [Electronic resourse] / K. Saavedra [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10

(5):e0125834. – Mode of access: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125834. – Date of access: 08.05.2016.

3. Aberrant methylation of Reprimo correlates with genetic instability and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma / N. Sato [et al.] // Cancer. – 2006. – Vol. 107, N 2. – P. 251–257.

4. Clopper, C. J. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial / C. J. Clopper, E. S. Pearson // Biometrika. – 1934. – Vol. 26. – P. 404–413.

5. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

6. Therneau, T. A package for survival analysis in S_ version 2.38 [Electronic resourse] / T. Therneau. – 2015. – Mode of access: http://CRAN.R-project.org/package=survival>. – Date of access: 12.09.2016.

7. Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of the patient with gastric cancer: present status and future perspectives / Y. Fujiwara [et al.] // Gastric Cancer. – 2007. – Vol. 10. – P. 197–204.

8. DNA damage-inducible gene, Reprimo functions as a tumor suppressor and is suppressed by promoter methylation in gastric cancer / A. Ooki [et al.] // Mol. Cancer Res. – 2013. – Vol. 11, N 11. – P. 1362–1374.

9. Loss of Reprimo and S100A2 expression in human gastric adenocarcinoma / J. Luo [et al.] // Diag. cytopathol. – 2011. – Vol. 39, N 10. – P. 752–757.

10. 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.

11. Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis / T. Yokota [et al.] // Scand. J. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 39. – P. 380–384.

12. 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.

13. Japanese Gastric Cancer Association Japanese classification of gastric carcinoma. 2nd English ed. // Gastric Cancer. – 2011. – Vol. 14. – P. 101–112.

14. Preoperative intraperitoneal chemotherapy for patients with serosa-infiltrating gastric cancer / M. Yano [et al.] // J. Surg. Oncol. – 2004. – Vol. 88. – P. 39–43.

References

1. Takahashi T., Suzuki M., Shigematsu H., Shivapurkar N., Echebiri C., Nomura M., Stastny V., Augustus M., Wu C. W., Wistuba I. I., Meltzer S. J., Gazdar A. F. “Aberrant methylation of Reprimo in human malignancies”, *Inernational Journal of Cancer*, 2005, vol. 115, pp. 503–510.

2. Saavedra K., Valbuena J., Olivares W., Marchant M. J., Rodríguez A., Torres-Estay V., Carrasco-Avino G., Guzmán L., Aguayo F., Carlos Roa J., Corvalán A. H. “Loss of Expression of Reprimo, a p53-induced Cell Cycle Arrest Gene, Correlates with Invasive Stage of Tumor Progression, p73 Expression in Gastric Cancer”, *PLoS One*, 2015, vol. 10 (5), pp. e0125834, Available at: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125834 (Accessed 08.05.2016).

3. Sato N., Fukushima N., Matsubayashi H., Iacobuzio-Donahue C. A., Yeo C. J., Goggins M. “Aberrant methylation of Reprimo correlates with genetic instability, predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma”, *Cancer*, 2006, vol. 107, no. 2, pp. 251–257.

4. Clopper C. J., Pearson E. S. “The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial”, *Biometrika*, 1934, vol. 26, pp. 404–413.

5. “R Core Team (2016). “R: A language, environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing”, Vienna, Austria, URL, Available at: https://www.R-project.org/ (Accessed 08.05.2016).

6. Therneau T. “A package for survival analysis in S_ version 2.38”, 2015, Available at: http://CRAN.R-project.org/package=survival> (Accessed 12.09.2016).

7. Fujiwara Y., Doki Y., Taniguchi H., Sohma I., Takiguchi S., Miyata H., Yamasaki M., Monden M. “Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of the patient with gastric cancer: present status, future perspectives”, *Gastric Cancer*, 2007, vol. 10, pp. 197–204.

8. Ooki A., Yamashita K., Yamaguchi K., Mondal A., Nishimiya H., Watanabe M. “DNA damage-inducible gene, Reprimo functions as a tumor suppressor, is suppressed by promoter methylation in gastric cancer”, *Molecular Cancer Research*, 2013, vol. 11, no. 11, pp. 1362–1374.

9. Luo J., Zhu Y., Yang G., Gong L., Wang B., Liu H. “Loss of Reprimo, S100A2 expression in human gastric adenocarcinoma”, *Diagnostic cytopathology*, 2011, vol. 39, no. 10, pp. 752–757.

10. Marutsuka T., Shimada S., Shiomori K., Hayashi N., Yagi Y., Yamane T., Ogawa M. “Mechanisms of peritoneal metastasis after operation for non-serosa invasive gastric carcinoma: an ultrarapid detection system for intraperitoneal free cancer cells, a prophylactic strategy for peritoneal metastasis”, *Clinical Cancer Research*, 2003, vol. 9, no. 2, pp. 678–685.

11. Yokota T., Ishiyama S., Saito T., Teshima S., Narushima Y., Murata K., Iwamoto K., Yashima R., Yamauchi H., Kikuchi S. “Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis”, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2004, vol. 39, no. 4, pp. 380–384.

12. Kodera Y., Yamamura Y., Shimizu Y., Torii A., Hirai T., Yasui K., Morimoto T., Kato T. “Peritoneal washing cytology: prognostic value of positive findings in patients with gastric carcinoma undergoing a potentially curative resection”, *Journal of Surgical Oncology*, 1999, vol. 72, pp. 60–65.

13. “Japanese Gastric Cancer Association Japanese classification of gastric carcinoma, 2nd English ed.”, *Gastric Cancer*, 2011, vol. 14, pp. 101–112.

14. Yano M., Yasuda T., Fujiwara Y., Takiguchi S., Miyata H., Monden M. “Preoperative intraperitoneal chemotherapy for patients with serosa-infiltrating gastric cancer”, *Journal of Surgical Oncology*, 2004, vol. 88, no. 1, pp. 39–43.

Информация об авторах

Ревтович Михаил Юрьевич – канд. мед. наук, доцент. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, Минский р-н, агр. Лесной, Республика Беларусь). E-mail: mihail_revtovich@yahoo.com

Шмак Андрей Иванович – д-р мед. наук, зав. лабораторией. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, Минский р-н, агр. Лесной, Республика Беларусь). E-mail: smak.ai@tut.by

Красько Ольга Владимировна – канд. техн. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 6, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: krasko@newman.bas-net.by

Смолякова Раиса Михайловна – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, Минский р-н, агр. Лесной, Республика Беларусь). E-mail: smol60@mail.ru

Бабенко Андрей Сергеевич – канд. хим. наук, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, Минский р-н, агр. Лесной, Республика Беларусь). E-mail: labmdbt@gmail.com

Information about the authors

Reutovich Mikhail Yur’evich – Ph. D. (Med.), Associate Professor. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (Lesnoy, 223040, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: mihail_revtovich@yahoo.com

Shmak Andrei Ivanavich – D. Sc. (Med.), Head of the Laboratory. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (Lesnoy, 223040, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: smak.ai@tut.by

Krasko Volha Vladimirauna – Ph. D. (Techn.), Associate Professor, Leading researcher. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: krasko@newman.bas-net.by

Smolyakova Raisa Mikhajlauna – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (Lesnoy, 223040, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail:smol60@mail.ru

Babenko Andrei Siarheevich – Ph. D. (Chem.), Head of the Department. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (Lesnoy, 223040, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: labmdbt@gmail.com

Для цитирования

Прогностическое значение метилирования гена *Reprimo* у пациентов с резектабельным раком желудка / М. Ю. Ревтович [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 66–77.

For citation

Reutovich M. Yu., Shmak A. I., Krasko O. V., Smolyakova R. M., Babenko A. S. “Prognostic value of *Reprimo* methylation in patients with resectable gastric cancer”. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 66–77.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616-006.66

Поступила в редакцию 19.09.2016
Received 19.09.2016

М. А. Деревянко[1], С. Н. Рябцева[2], И. В. Залуцкий[1]

[1] Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА С РАЗНЫМИ ФОРМАМИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ

В данной работе представлены результаты анализа клинико-морфологических и морфометрических факторов у 90 пациентов с колоректальным раком (КРР). Установлено, что аденокарцинома сигмовидной кишки характеризуется наибольшим риском гематогенного распространения опухоли. С увеличением глубины инвазии опухоли в стенку толстой кишки и при наличии поражения лимфатических узлов распространенность гематогенных метастазов повышается. Для диссеминированного КРР характерно преобладание стромального компонента опухоли над паренхиматозным в зоне глубокой инвазии.

Ключевые слова: колоректальный рак, прогрессирование, метастазы, паренхиматозно-стромальное соотношение.

M. A. Derevyanko[1], S. N. Rjabceva[2], I. V. Zalutskii[1]

[1]Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF COLORECTAL CANCER WITH DIFFERENT FORMS OF SPREAD

This article presents the analysis of clinical, morphological and morphometric factors in 90 patients with colorectal cancer. It is noted that adenocarcinoma of the sigmoid colon is characterized by the greatest risk of hematogenous spread of the tumor. The hematogenous metastases percent increases with increasing depth of tumor invasion and the presence of lymph nodes lesion. Metastatic colorectal cancer is characterized by the predominance of the tumor stromal component in the area of deep invasion.

Keywords: colorectal cancer, progression, metastasis, parenchymal-stromal ratio.

Введение. Колоректальный рак (КРР), или рак толстой кишки, занимает 3-е место в мире по частоте среди всех злокачественных опухолей [1]. Согласно данным литературы последних лет, наблюдается неуклонный рост заболеваемости КРР во всем мире. Ежегодно регистрируют более 1 млн пациентов с КРР и около 700 тыс. смертей от него [1]. В течение последних десятилетий в Республике Беларусь отмечается стойкий рост заболеваемости КРР: рак толстой кишки вышел на 1-е место в структуре онкологической заболеваемости населения г. Минска, на 3–4-е место по стране и характеризуется высокими показателями смертности [2–4].

Прогностическая оценка новообразования основана преимущественно на изучении паренхиматозного компонента. Однако традиционное исследование опухолевых клеток в новообразованиях не всегда позволяет адекватно оценить характер прогрессирования опухоли, что весьма важно для оценки течения заболевания, распространения опухоли и прогноза ее развития [5].

Полученные в последние десятилетия данные показывают, что прогрессирование злокачественных опухолей зависит не только от свойств раковых клеток, но и от стромального микроокружения опухоли, которое включает межклеточный матрикс, кровеносные сосуды, клетки воспалительного инфильтрата и фибробласты [6, 7]. Следует отметить, что клетки стромы не являются злокачественными и служат для поддержания нормальной структуры и функции тканей. Однако изменение взаиморегуляции между структурными элементами паренхимы и стромы приводит к тому, что нормальные клетки стромы приобретают аномальные фенотипы, которые содействуют росту и прогрессированию опухоли [6, 8].

© Деревянко М. А., Рябцева С. Н., Залуцкий И. В., 2017

Анализ состояния стромы рака различной локализации и оценка ее роли в прогрессировании опухоли исследованы в работе [8]. Важная роль стромального компонента в канцерогенезе обусловливает необходимость поиска стромальных факторов прогноза течения КРР, выяснения особенностей клеток и внеклеточных структур соединительной ткани, что позволит оптимизировать прогноз течения заболевания и изучить чувствительность опухоли на применяемые методы терапии.

Цель работы – выявить факторы прогрессирования колоректального рака.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования послужили фрагменты толстой кишки со злокачественной опухолью и данные медицинских карт 90 пациентов в возрасте от 31 года до 85 лет, проходивших хирургическое лечение в ЛПУ «Минский городской клинический онкологический диспансер» за период с 2014 по 2015 гг.

Фрагменты опухоли были зафиксированы в формалине и заключены в парафиновые блоки, затем из них были приготовлены гистологические микропрепараты, которые окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Для анализа полученных гистологических препаратов оценивали степень дифференцировки опухоли, глубину поражения кишечной стенки, наличие или отсутствие лимфогенных и гематогенных метастазов.

С целью изучения микропрепаратов и изготовления микрофотографий использовали световой микроскоп OptecBK 5000 с цифровой камерой (Optec, Китай) с 20- и 40-кратным увеличением. Морфометрический анализ выполняли с помощью программы ImageJ (США). В каждом случае в 5 полях зрения при 40-кратном увеличении фотографировали область поверхностного роста и глубокой инвазии опухоли. С помощью приложения Freehand selections измеряли площадь паренхимы (S_p, мкм^2) и площадь стромы (S_m, мкм^2) в зоне поверхностного роста опухоли и глубокой инвазии. Затем рассчитывали показатель паренхиматозно-стромального соотношения (ПСС) в каждой группе исследования по формуле ПСС = S_p:S_m.

Базы данных с результатами морфологических исследований формировали с помощью программы MS Excel. Для статистического анализа полученных результатов использовали программу Statistica 6.1. Значения исследуемых показателей представлены в виде среднего арифметического значения (M) и ошибки среднего (m). С целью проверки статистической нулевой гипотезы об однородности групп исследования использовали непараметрические методы: при сравнении двух групп – непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, при сравнении более двух групп – *H*-критерий Краскала–Уоллиса ($p < 0{,}05$).

Результаты и их обсуждение. Количество пациентов мужского и женского пола было практически равным: 46 (51,1 %) и 44 (48,9 %) человека соответственно. Средний возраст пациентов составил 64,9 ± 1,1 года. Средний возраст мужчин и женщин значимо не различался и составил 65,2 ± 1,5 и 64,6 ± 1,6 года соответственно.

В зависимости от локализации первичного опухолевого процесса в толстой кишке получены следующие данные: рост опухоли чаще наблюдался в сигмовидной кишке 38 (42,2 %) пациентов, ректосигмоидный отдел был поражен у 20 (22,2 %) человек, у 16 (17,8 %) пациентов рак выявлялся в различных отделах ободочной кишки (у 4 – в восходящем, у 7 – в нисходящем, у 2 – в поперечном, у 2 – в области селезеночного изгиба, у 1 – в области печеночного изгиба). У 10 (11,1 %) пациентов первичная опухоль локализовалась в прямой кишке, у 6 (6,7 %) – в слепой кишке.

В соответствии с Международной классификацией опухолей желудочно-кишечного тракта с учетом TNM-системы пациенты были разделены на три группы исследования. В первую группу вошли пациенты с местным распространением рака толстой кишки, во вторую – лица с локально-регионарным распространением опухоли, в третью – пациенты с диссеминированным ростом КРР (табл. 1).

У пациентов каждой группы изучены следующие параметры: возраст пациента, локализация опухоли в кишечнике, степень дифференцировки опухоли, глубина поражения кишечной стенки, наличие или отсутствие метастазов в регионарные лимфатические узлы и гематогенные отсевы опухоли (табл. 2).

Таблица 1. **Клиническая характеристика групп исследования больных КРР**
Table 1. **Clinical characteristics of the study groups of patients with colorectal cancer**

Группа исследования	К-во пациентов	М/ж (абс.)	Возраст, лет (M±m)	Частота КРР, %
1	30	16/14	64,9 ± 1,9	33,3
2	36	18/18	66,0 ± 1,8	40
3	24	12/12	63,3 ± 1,9	26,7
Всего	90	46/44	64,9 ± 1,1	100

Таблица 2. **Морфологическая характеристика групп исследования**
Table 2. **Morphological characteristics of the study groups**

Группа исследования	Степень дифференцировки опухоли, %			Глубина инвазии, %			Наличие метастазов, %	
	высокая	умеренная	низкая	T1-2	T3	T4	лимфогенных	гематогенных
1	60	40	–	–	96,	3,3	0	0
2	41,7	44,4	13,9	–	10	–	100	0
3	54,2	37,5	8,3	4,2	83,3	12,4	79,2	100

В ходе статистической обработки данных установлено, что прогрессирование опухоли не зависит от пола и возраста заболевших КРР: количество мужчин и женщин в группах было практически равным ($p > 0,05$). Кроме того, несмотря на то что в группе пациентов с диссеминированным раком толстой кишки возраст был наименьшим, статистической значимой зависимости от возраста не выявлено ($p > 0,05$). В ходе исследования установлено, что прогрессирование заболевания не зависит от степени дифференцировки аденокарциномы толстой кишки ($p > 0,05$): практически в равной степени отмечалось гематогенное и лимфогенное метастазирование у пациентов с умеренно- и высокодифференцированной аденокарциномой толстой кишки.

Статистическая обработка данных показала, что относительное количество гематогенных метастазов КРР статистически значимо зависит от локализации опухоли, глубины инвазии и наличия лимфогенных метастазов. Так, наиболее высокий процент развития гематогенных метастазов (45,8 %) наблюдался при локализации опухоли в стенке сигмовидной кишки, при локализации опухоли в других отделах кишки этот показатель был статистически значимо ниже ($p < 0,05$). С увеличением глубины инвазии опухоли в стенку толстой кишки отмечалось неуклонное повышение показателя частоты метастазирования в печень. Так, при инвазии опухоли в слизисто-подслизистый слой (T1) и мышечную оболочку (T2) выявлен одинаковый показатель метастазирования – 4,2 %. Однако данный показатель значительно возрастал (до 79,2 %) при вовлечении в опухолевый процесс субсерозной оболочки стенки толстой кишки (T3) ($p < 0,05$). Наличие метастатического поражения регионарных лимфатических узлов более чем в 3 раза ухудшало прогноз. Так, при отсутствии поражения регионарных лимфатических узлов частота развития метастазов в печени составила 20,8 %, а при наличии их поражения – 79,2 % ($p < 0,05$).

Совокупность полученных морфометрических показателей площади паренхиматозного, стромального компонента опухоли и паренхиматозно-стромального соотношения в группах представлена в табл. 3. Статистическая обработка морфометрических данных показала, что во всех группах исследования в зоне поверхностного роста площадь паренхиматозного компонента опухоли больше, чем площадь стромального компонента, – 73,4; 67,0 и 63,2 % соответственно (табл. 3). Соотношение паренхимы к строме было 2,8:1,0; 2,0:1,0 и 1,7:1,0 соответственно.

В первой и второй группах исследования в зоне глубокой инвазии также выявлено преобладание паренхиматозного компонента над стромальным (процентное соотношение компонентов паренхимы – 71,4 и 61,3 % соответственно). ПСС составило 2,5:1,0 в первой группе и 1,6:1,0 во второй группе. В первых двух группах исследования отмечено увеличение площади стромального компонента и изменение ПСС за счет снижения площади паренхимы опухоли в зонах глу-

Т а б л и ц а 3. **Морфометрическая характеристика групп исследования**

T a b l e 3. **Morphometric characteristics of the study groups**

Группа исследования	Площадь компонентов, %				ПСС, %	
	Зона поверхностного роста		Зона глубокой инвазии		Зона поверхностного роста	Зона глубокой инвазии
	Паренхима	Строма	Паренхима	Строма		
1	73,4	26,6	71,4	28,6	2,8:1,0	2,5:1,0
2	67,0	33	61,3	38,7	2,0:1,0	1,6:1,0
3	63,2	36,8	44,9	55,1	1,7:1,0	1,0:1,4

бокой инвазии по сравнению с зоной поверхностного роста. Однако статистически значимых различий по ПСС в различных зонах роста при местном (p = 0,650) и регионарном (p = 0,364) распространении опухолевого процесса не выявлено.

В третьей группе исследования у пациентов с диссеминированным распространением рака толстой кишки в зоне глубокой инвазии опухоли выявлено изменение ПСС (1,0:1,4) с преобладанием стромального (55,1 %) компонента над паренхиматозным (44,9 %). При диссеминированном распространении опухолевого процесса установлены статистически значимые различия по ПСС в различных зонах роста опухоли (p = 0,010). Отмечено преобладание в данной группе стромального компонента над паренхиматозным в зонах глубокой инвазии по сравнению с зоной поверхностного роста.

Во всех исследованных группах отмечалось снижение процентного соотношения площади паренхимы с соответствующим увеличением площади стромального компонента опухоли в зоне глубокой инвазии по сравнению с зоной поверхностного роста. Однако статистически значимых достоверных отличий по площади анализируемых морфометрических параметров КРР в зоне поверхностного роста у пациентов групп исследования не выявлено ($p > 0,05$ для всех параметров). С другой стороны, в зоне глубокой инвазии опухоли установлены статистически значимые достоверные различия по площади паренхиматозного (p = 0,005), стромального (p = 0,005) компонентов и ПСС (p = 0,005) в зависимости от характера распространения опухолевого процесса.

Выводы

1. Прогрессирование заболевания не зависит от возраста/пола пациентов и степени дифференцировки аденокарциномы толстой кишки.

2. С увеличением глубины инвазии опухоли в стенку толстой кишки и при наличии лимфогенного распространения рака повышается риск развития гематогенных метастазов.

3. При раке сигмовидной кишки повышается риск гематогенного распространения опухоли.

4. Статистически значимое снижение паренхиматозно-стромального соотношения в поверхностных зонах роста опухоли установлено при диссеминированных формах рака толстой кишки по сравнению с местным и локально-регионарном распространением.

5. Преобладание стромального компонента в зоне глубокой инвазии характерно для рака толстой кишки с высоким злокачественным потенциалом.

Список использованных источников

1. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / R. Labianca [et al.] // Annals of Oncol. – 2013. – Vol. 24. – P. 64–72.

2. Злокачественные новообразования в Беларуси: преждевременная смертность населения трудоспособного возраста, социальные потери / Н. Н. Антоненкова [и др.] // «Актуальные вопросы диагностики и лечения злокачественных новообразований»: материалы Респ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию кафедры. – Минск, 2014. – С. 13.

3. Кохнюк, В. Т. Распространенность, диагностика и результаты лечения колоректального рака у жителей Беларуси / В. Т. Кохнюк // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2013. – № 2. – С. 118–123.

4. Суконко, О. Г. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь / О. Г. Суконко; РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова. – Минск, 2012.

5. Hanchen, Li. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer / Li. Hanchen, F. Xueli, J. M. Houghton // J. of Cell. Biochem. – 2007. – Vol. 101. – P. 805–815.

6. Adjei, I. M. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach / I. M. Adjei, S. Blanka // J. of Functional Biomaterials. – 2015. – Vol. 6. – P. 81–103.

7. Dudas, J. Supportive and rejective functions of tumor stroma on tumor cell growth, survival, and invasivity: the cancer evolution / J. Dudas // Mol. and Cell. Oncol. – 2015. – Vol. 5, N 44. – P. 1–2.

8. Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth / K. Shiga [et al.] // Cancers. – 2015. – Vol. 7, N 4. – P. 2443–2458.

References

1. Labianca R., Nordlinger B., Beretta G. D., Mosconi S., Mandalà M., Cervantes A. "Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, follow-up", *Annals of Oncology*, 2013, vol. 24, pp. 64–72.

2. Antonenkova N. N., Moiseev P. I., Mashevskii A. A., Yakimovich G. V. "Malignant neoplasms in Belarus: premature mortality working-age population, social costs", *Aktual'nye voprosy diagnostiki i lecheniya zlokachestvennykh novoobrazovanii: sbornik nauchnykh rabot Respublikanskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 40-letiyu kafedry onkologii BGMU*, in Prokhorov, A. V. (ed.) [Current Problems of Diagnosis and Treatmant of Malignant Neoplasms: a collection of scientific works of the Republican scientific-practical conference dedicated to the 40th anniversary of chair of of Oncology BSMU], Minsk, Belarus, 2014, p. 13–14.

3. Kokhnyuk V. T. "Occurrence, diagnosis and treatment results of colorectal cancer of inhabitants of Belarus", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Series of Medical Sciences], 2013, no. 2, pp. 118–123.

4. Sukonko O. G., *Statistika onkologicheskikh zabolevanii v Respublike Belarus'* [Statistics of oncological diseases in the Republic of Belarus], RSPC OMP them. N. N. Alexandrov, Minsk, BY, 2012.

5. Hanchen Li., Xueli F., Houghton J. M. "Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer", *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, vol. 101, pp. 805–815.

6. Adjei I. M., Blanka S. "Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach", *Journal of Functional Biomaterials*, 2015, vol. 6, pp. 81–103.

7. Dudas J. "Supportive, rejective functions of tumor stroma on tumor cell growth, survival, invasivity: the cancer evolution", *Molecular, Cellular Oncology*, 2015, vol. 5, no. 44, pp. 1–2.

8. Shiga K., Hara M., Nagasaki T., Sato T., Takahashi H., Takeyama H. "Cancer-associated fibroblasts: their characteristics, their roles in tumor growth", *Cancers*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 2443–2458.

Информация об авторах

Деревянко Марина Александровна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mari.derewianko@mail.ru

Рябцева Светлана Николаевна – канд. мед. наук, ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр-кт Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sveta.rjabceva@tut.by

Залуцкий Иосиф Викторович – чл.-кор., д-р мед. наук, профессор, директор Института физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: IZalutsky@gmail.com

Information about the authors

Derevyanko Marina Alexandrovna – Postgraduate student, Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mari.derewianko@mail.ru

Rjabceva Svetlana Nikolaevna – Ph. D. (Med.), Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sveta.rjabceva@tut.by

Zalutskii Iosif Viktorovich – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Director of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus.). E-mail: IZalutsky@gmail.com

Для цитирования

Деревянко, М. А. Клинико-морфологическая и морфометрическая характеристика колоректального рака с разными формами распространения / М. А. Деревянко, С. Н. Рябцева, И. В. Залуцкий // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 78–82.

For citation

Derevyanko M. A., Rjabceva S. N., Zalutskii I. V. "Clinical and morphological and morphometric characteristics of colorectal cancer with different forms of spread". *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 78–82.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616.127:616-076.4

Поступила в редакцию 14.11.2016
Received 14.11.2016

Л. И. Арчакова, С. А. Новаковская

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТРАЦИКЛИНОВОЙ КАРДИОМИОПАТИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКА ДОКСОРУБИЦИНА

Электронно-микроскопическим методом с применением общепринятой модели острой, подострой и хронической антрациклиновой кардиомиопатии изучены морфологические основы токсического действия антрациклинового антибиотика доксорубицина на сердечную мышцу и определена динамика поражения миокарда при действии указанного препарата. Установлена дистрофия кардиомиоцитов и деградация их сократительного и энергетического аппарата, активация процессов апоптоза в сочетании с некрозом, аутофагией гибнущих клеток и развитием обширного заместительного фиброза, приводящих к необратимой дилатации миокарда и последующей хронической сердечной недостаточности.

Ключевые слова: доксорубицин, кардиомиопатия, дистрофия, апоптоз, некроз.

L. I. Archakova, S. A. Novakovskaya

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

CELL MECHANISMS OF ANTRACYCLINE CARDIOMYOPATHY UNDER ANTIBIOTIC DOXORUBICIN TREATMENT

In this article we presented the results of electron microscopy of the laboratory rat myocardium after doxorubicin treatment. The heart damage and the development of cardiomyopathy under antracycline antibiotic doxorubicin were established. Pathogenesis and morphology of heart complications caused by this cytostatic were studied. It was established that doxorubicin induces dystrophy, necrosis, apoptosis, and autophagy in some cardiomyocytes of damage heart. Fibrosis of the connective tissue in myocardium is a cause of tissue ischemia and the development of chronic heart failure.

Keywords: doxorubicin treatment, cardiomyopathy, electron microscopy, necrosis, apoptosis.

Введение. Антибиотики антрациклинового ряда широко используются в медицине при лечении злокачественных опухолей различной локализации. Однако наряду с выраженным противоопухолевым действием антрациклины обладают опасным для жизни побочным кардиотоксическим эффектом, приводящим к развитию кардиомиопатий и застойной сердечной недостаточности в различные периоды после лечения [1–4].

Основным лимитирующим фактором проведения цитостатической терапии нередко является кардиотоксическое действие антрациклинов, которое бывает настолько серьезным, что вынуждает прекратить лечение еще до достижения противоопухолевого эффекта [5]. Опасность антрациклиновых повреждений сердца заключается в трудностях их диагностики, а также в длительном скрытом течении, высокой частоте развития этих повреждений и вероятности их возникновения не только в период проведения противоопухолевой терапии, но и в отдаленные сроки после лечения. При этом возникающие осложнения неуклонно прогрессируют, вплоть до развития необратимой застойной сердечной недостаточности.

В связи с этим проблема поражения сердца антрациклиновыми цитостатиками остается чрезвычайно актуальной. Поиск наиболее эффективных способов подавления кардиотоксичности антрациклинов зависит от знания механизмов патогенеза и своевременной диагностики данного осложнения.

В основе токсического поражения сердечной мышцы антибиотиками антрациклинового ряда лежит прямое повреждение миоцитов [6]. Антрациклины связываются с сократительными белками клеток сердца, повреждают их структуру, индуцируя лизис миофибрилл, что в совокупности приводит к значительному снижению сократимости миокарда.

© Арчакова Л. И., Новаковская С. А., 2017

Наибольшее повреждающее действие оказывают метаболиты антрациклинов, которые проникают в клеточное ядро и связываются с ДНК, нарушая синтез нуклеиновых кислот и белков [7–13].

Полагают, что антрациклиновые метаболиты, изменяя гомеостаз железа в сердечных миоцитах, способствуют развитию антрациклиновой кардиотоксичности [14].

Патогенетические механизмы развития антрациклиновой кардиотоксичности, сопровождающиеся повреждением миокарда, связаны с процессами свободнорадикального окисления липидов и дестабилизации биологических мембран клеток различной морфо-функциональной организации.

Большое значение в развитии антрациклиновой кардиотоксичности придается индуцированному антрациклинами апоптозу. Однако вопрос о механизмах вовлечения апоптоза в патологический процесс при действии антрациклиновых антибиотиков, в частности доксорубицина, остается дискуссионным. Согласно данным ряда исследователей, при остром действии доксорубицина выявить апоптоз не удалось, в то время как при хроническом действии морфологически он определялся [15].

Предполагается, что одним из механизмов развития повреждений миокарда в отдаленном периоде может быть спровоцированная антрациклинами экспрессия кардиальных генов [16, 17].

По срокам развития кардиотоксичности разделяют острую, подострую и хроническую антрациклиновую кардиомиопатию. Хроническая поздняя кардиомиопатия в настоящее время является основной проблемой онкологии. Развивается она преимущественно у пациентов, у которых ранее диагностировалась острая антрациклиновая кардиотоксичность [18].

К настоящему времени в литературе описаны основные морфологические признаки острого кардиотоксического действия антрациклинов [19]. В то же время данных об изучении сложных механизмов и закономерностей развития антрациклиновой кардиомиопатии при подостром и хроническом действии данного цитостатика морфологическими методами крайне недостаточно.

Цель настоящего исследования – изучение морфологических основ клеточных механизмов патологических процессов в миокарде при остром, подостром и хроническом действии антрациклинового антибиотика доксорубицина.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на 70 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных [20, 21].

Объектом исследования являлся миокард левого желудочка сердца крыс. Модель острой антрациклиновой кардиомиопатии создавали путем однократного внутрибрюшинного введения экспериментальным животным антрациклинового антибиотика доксорубицина в кумулятивной дозе 15 мг/кг согласно общепринятой в мировой литературе схеме [22]. Миокард подвергался морфологическому исследованию на 4-е сутки после введения препарата.

Модель подострой формы антрациклиновой кардиомиопатии создавали путем 6-кратного внутрибрюшинного введения препарата доксорубицина по 2,5 мг/кг в течение 2 недель в той же кумулятивной дозе. Объект исследований изучали на 4, 30 и 60-е сутки после последнего введения препарата.

Хроническую антрациклиновую кардиомиопатию моделировали путем внутрибрюшинного введения доксорубицина в кумулятивной дозе 16 мг/кг в течение 2 мес. (еженедельно по 2 мг/кг в течение 8 недель) [22]. Животные в виварии находились на стандартном содержании и питании, из эксперимента их выводили на 4, 30 и 60-е сутки после последней инъекции препарата.

Контролем служили крысы, которым в эквивалентном объеме внутрибрюшинно вводили 0,9 %-ный раствор хлорида натрия.

В работе использован электронно-микроскопический метод исследования. У крыс под эфирным наркозом экстирпировали участки миокарда левого желудочка и фиксировали в растворе, состоящем из 3 %-ного раствора глутарового альдегида и 1 %-ного раствора параформа, затем материал измельчали и обрабатывали 2 %-ным раствором четырехокиси осмия. После промывания 0,1 М фосфатным буфером материал обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и за-

ключали в аралдит по общепринятой методике [23]. Срезы готовили на ультратоме LKB-8800 (Швеция) и просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (Jeol, Япония).

Результаты и их обсуждение. При электронно-микроскопическом исследовании миокарда левого желудочка сердца экспериментальных крыс с применением модели острой доксорубицин-индуцированной антрациклиновой кардиомиопатии на 4-е сутки после однократного введения доксорубицина в дозе 15 мг/кг выявлено острое токсическое поражение структурных компонентов сердечной мышцы – кардиомиоцитов (КМЦ), сосудов, соединительной ткани и интерстиция. Так, в отличие от КМЦ интактных животных, в мышечных клетках миокарда крыс с отстрой формой доксорубицин-индуцированной кардиомиопатии отмечалось развитие таких деградирующих процессов, как необратимая деструкция и некроз. Мишенью повреждающего действия доксорубицина являлись митохондриальный и миофибриллярный аппарат КМЦ, клеточные мембраны, эндотелий сосудов микроциркуляторного русла миокарда (рис. 1–4).

На фоне острого токсического действия антрациклинового антибиотика доксорубицина наблюдались разрушение и фрагментация миофибрилл КМЦ, уплотнение и вакуолизация митохондрий и саркоплазмы, формирование фаголизосом на месте распавшихся органелл. Одновременно с этим в миоцитах происходили активация внутриклеточного миоцитолизиса и образование обширных очагов некроза, а также реорганизация сосудов микроциркуляторного русла с резким сокращением числа функционирующих капилляров вследствие их разрушения. В результате нарастающей эндотелиальной дисфункции увеличивался отек интерстициального пространства миокарда.

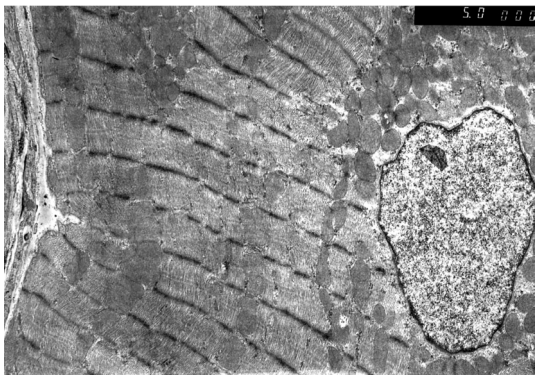


Рис. 1. Ультраструктура интактного кардиомиоцита миокарда лабораторной крысы. ×5000

Fig. 1. Ultrastructure of intact cardiomyocyte of laboratory rat. ×5000

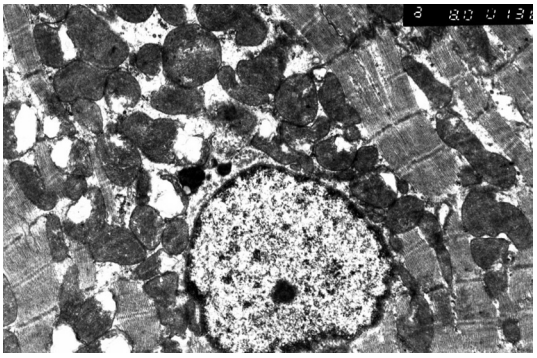


Рис. 2. Ультраструктура пораженного кардиомиоцита после острого действия доксорубицина. ×6000

Fig. 2. Ultrastructure of damage cardiomyocyte after acute doxorubicin treatment. ×6000

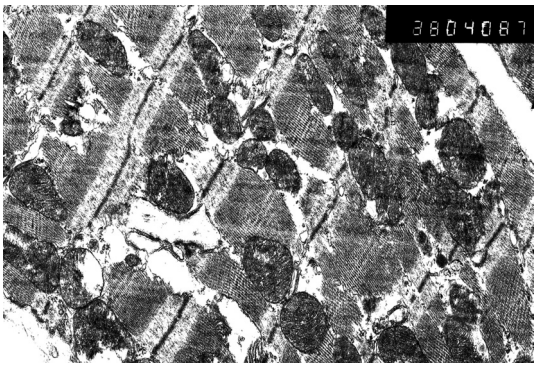


Рис. 3. Деструкция миофибрилл пораженного кардиомиоцита после острого действия доксорубицина. ×8000

Fig. 3. Damage myofibrills of rat myocardium after acute doxorubicin treatment. ×8000

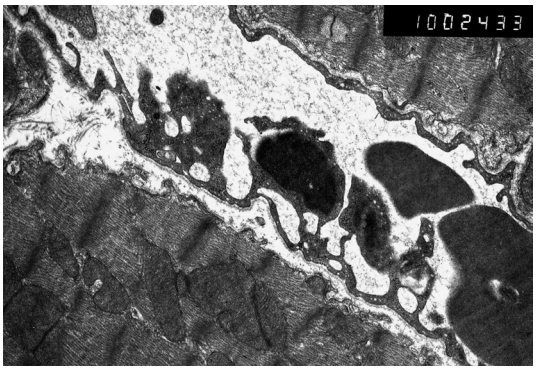


Рис. 4. Ультраструктура пораженного эндотелия капилляра миокарда крысы после острого действия доксорубицина. ×10 000

Fig. 4. Ultrastructure of damage endothelium of myocardium capillary after acute doxorubicin treatment. ×8000

Изучение миокарда на модели подострой формы антрациклиновой кардиомиопатии на 4-е сутки после 6-кратного введения препарата доксорубицина по 2,5 мг/кг в течение 2 недель показало выраженное повреждающее действие доксорубицина на сердечную мышцу. Деструктивные изменения, развивавшиеся в КМЦ, клеточных структурах интерстициального пространства и сосудах микроциркуляторного русла, свидетельствовали о ремоделировании миокарда и нарушении функции органа. Наблюдавшиеся в КМЦ явления миоцитолизиса, разрушения саркоплазмы сердечных миоцитов и внутриклеточных органелл (митохондрий, саркоплазматического ретикулума) свидетельствовали о развитии в миокарде некротического процесса (рис. 5). Отмечалось повышение числа активных макрофагов в интерстиции миокарда. Активизация лизосомального аппарата сердечной мышцы и образование аутофаголизосом в ответ на токсическое действие доксорубицина указывали на повышение активности гидролитических лизосомальных ферментов и разрушение клеточного вещества путем аутофагии (рис. 6).

Анализ структурной организации миокарда на 30-е и 60-е сутки после последней инъекции препарата при моделировании подострой формы антрациклиновой кардиомиопатии свидетельствовал о прогрессировании дистрофических процессов в структурных элементах миокарда и нарастании в них процессов некроза и апоптоза. В отличие от некроза, при апоптозе происходило уплотнение и сморщивание всей пораженной клетки и образующихся в ней клеточных фрагментов, формирование апоптозных тел, которые затем захватывались соседними клетками посредством фагоцитоза и переваривались ими. Описанные деструктивные процессы приводили к гибели клеточных структур и формированию заместительного фиброза в сердечной мышце.

Характерной особенностью протекания патологических процессов в миокарде при подострой форме кардиомиопатии являлось сочетание некротических и апоптотических изменений одновременно не только в разных, но и в одном и том же КМЦ. Отмечалось интенсивное разрушение сосудистого русла миокарда, увеличение площади интерстициального фиброза и отека интерстиция миокарда (рис. 7).

Динамика развития хронической формы антрациклиновой кардиомиопатии изучалась на экспериментальной модели в разные сроки после последнего введения доксорубицина – на 4, 30 и 60-е сутки. В ходе проведенных исследований установлено, что в указанные сроки действия препарата хроническая антрациклиновая кардиомиопатия характеризуется нарастанием дистрофических процессов в КМЦ и деградацией их сократительного и энергетического аппарата, активацией процессов апоптоза в сочетании с некрозом и аутофагией гибнущих клеток, развитием обширного заместительного фиброза, приводящих к необратимой дилатации миокарда и последующему развитию хронической сердечной недостаточности (рис. 8–10).

Полученные данные позволили сделать вывод, что эффект кардиотоксического действия доксорубицина зависит от схемы введения препарата. При однократном введении кумулятивной

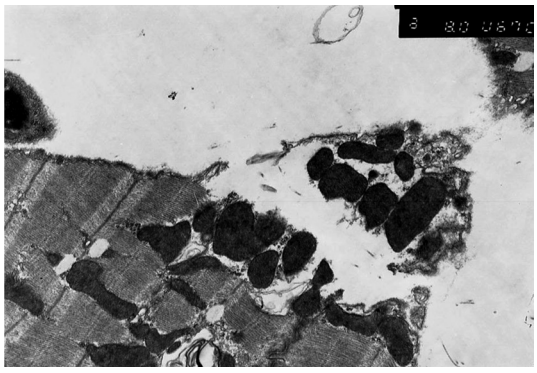


Рис. 5. Очаговый некроз саркоплазмы кардиомиоцита после подострого действия доксорубицина. ×8000

Fig. 5. Local necrosis of cardiomyocyte after subacute doxorubicin treatment. ×8000

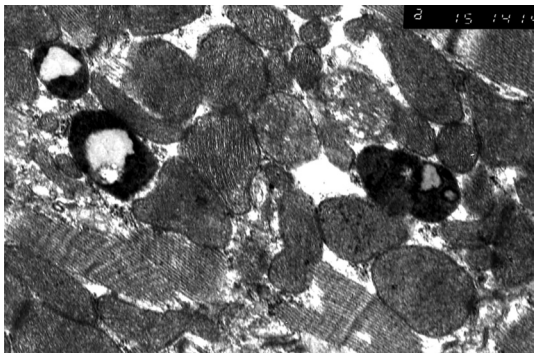


Рис. 6. Аутофаголизосомы в саркоплазме кардиомиоцита после подострого действия доксорубицина (процессы аутофагии в кардиомиоците). ×15 000

Fig. 6. Autophagolizosoma in cardiomyocyte after subacute doxorubicin treatment (processes of autophagy in cardiomyocyte). ×15 000

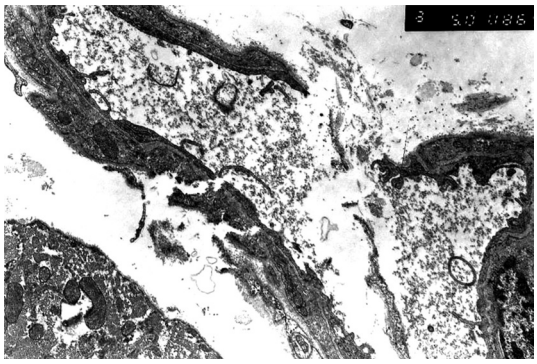


Рис. 7. Деструкция сосудистого русла миокарда после подострого действия доксорубицина. ×5000

Fig. 7. Damage vessels of the rat myocardium after sub-acute doxorubicin treatment. ×5000

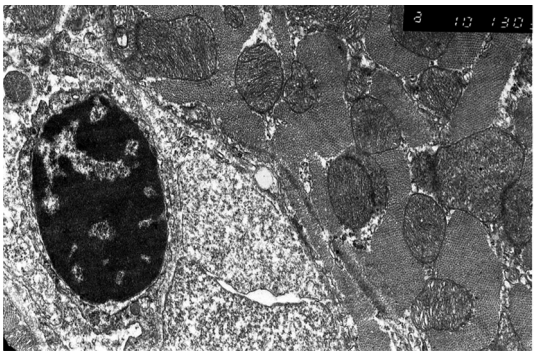


Рис. 8. Апоптоз эндотелиоцита капилляра миокарда после хронического действия доксорубицина. ×10 000

Fig. 8. Apoptosis of endotheliocyte of the capillary myocardium after chronic doxorubicin treatment. ×10 000

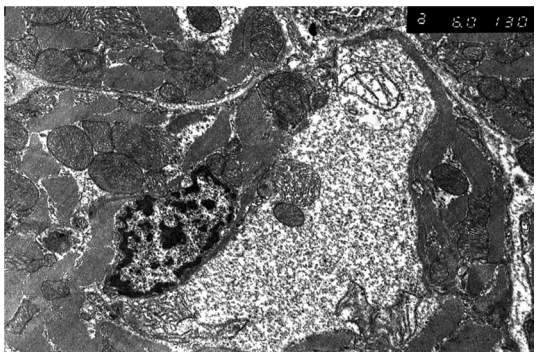


Рис. 9. Очаговый некроз саркоплазмы кардиомиоцита миокарда после хронического действия доксорубицина. ×6000

Fig. 9. Local necrosis of cardiomyocyte sarcoplasm of the myocardium after chronic doxorubicin treatment. ×6000

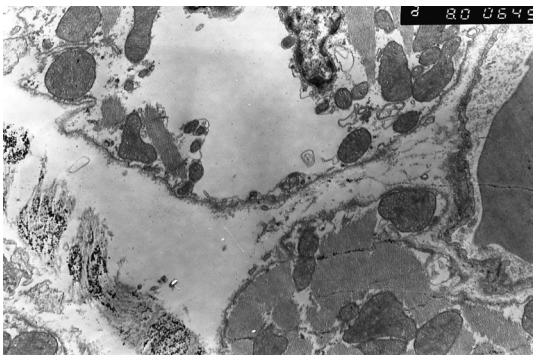


Рис. 10. Деструкция кардиомиоцита в результате интенсивной аутофагии после хронического действия доксорубицина. ×8000

Fig. 10. Cardiomyocyte damage as a result of intensive autophagy after chronic doxorubicin treatment. ×8000

дозы доксорубицина (15 мг/кг) отмечался острый токсический эффект препарата на митохондрии, сократительный аппарат КМЦ и цитоплазматические мембраны клеток.

При подостром и хроническом действии доксорубицина в той же кумулятивной дозе деструктивный кардиотоксический эффект сохранялся и становился необратимым вследствие развития процессов апоптоза, некроза и аутофагии. В данных условиях эксперимента доксорубицин оказывал более длительное угнетающее влияние на митохондрии КМЦ. Наряду с этим происходило нарастание дисфункции эндотелия микрососудов, связывание цитостатика с ДНК и ее фрагментация, а также развитие других патологических процессов, лежащих в основе патогенеза развивающейся антрациклиновой кардиомиопатии.

Заключение. Результаты проведенных морфологических исследований иллюстрируют динамику и выраженность реакций разных структурных компонентов миокарда и их цитоплазматических органелл при острой, подострой и хронической формах доксорубицин-индуцированной антрациклиновой кардиомиопатии, а кроме того, свидетельствуют о развитии регенераторно-пластической недостаточности миокарда при действии антибиотиков антрациклинового ряда.

Определены клеточные мишени действия доксорубицина в КМЦ (митохондрии, миофибриллы, клеточные мембраны, ядро) и сосудах (эндотелиоциты) на разных стадиях развития антрациклиновой кардиомиопатии.

На основании выявленных характерных структурных изменений сердечной мышцы определены ультраструктурные критерии поражения миокарда на разных этапах патогенеза при острой, подострой и хронической формах доксорубициновой кардиомиопатии, которые характеризуются изменениями организации КМЦ за счет деградации миофибрилл и митохондрий, раз-

рушением клеточных мембран и сосудов микроциркуляторного русла, развитием заместительного фиброза. Установлено, что разрушение и элиминация КМЦ при развитии антрациклиновой кардиомиопатии обусловлены развитием процессов некроза, апоптоза и аутофагии.

Список использованных источников

1. Чернова, В. А. Лекарственные и диагностические средства, применяемые в онкологической практике / В. А. Чернова. – М.: Медицина, 1982. – 216 с.

2. Лушникова, Е. Л. Морфологические и молекулярно-генетические основы дилатационной кардиомиопатии / Е. Л. Лушникова, Л. М. Непомнящих, В. Д. Розенберг. – М.: Изд-во РАМН, 2004. – 191 с.

3. Doroshow, J. H. Doxorubicin-induced cardiac toxicity / J. H. Doroshow // N. Engl. J. Med. – 1991. – Vol. 21. – P. 843–845.

4. Hanai, K. Evaluation of cardiac function by echocardiography in dogs treated with doxorubicin / K. Hanai, K. Takaba, S. Manabe // J. Toxicol. Sci. – 1996. – Vol. 21, N 1. – P. 1–10.

5. Grenier, M. A. Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults / M. A. Grenier, S. E. Lipshultz // Semin. Oncol. – 1998. – Vol. 25 (Suppl. 10). – P. 72–85.

6. Ferrans, V. J. Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy / V. J. Ferrans, J. R. Clark, Jun Zhang // Tsitologiia. – 1997. – Vol. 39, N 10. – P. 928–937.

7. Lewis, W. Interaction of adriamycin *in vitro* with cardiac myofibril proteins / W. Lewis, J. Kleinerman, S. Puszkin // Cancer Res. – 1982. – Vol. 50. – P. 547–553.

8. Olson, R. D. Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite, doxorubicinol / R. D. Olson, P. S. Mushlin, D. E. Breuner // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – Vol. 85. – P. 3585–3589.

9. Sacco, G. Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation and reactivity / G. Sacco, R. Giampietro, E. Salvatorelli // Br. J. Pharmacol. – 2003. – Vol. 139, N 3. – P. 641–651.

10. Rosenhoff, S. H. Alteration in DNA synthesis in cardiac tissues induced by adriamycin in vivo-relationship to fatal toxicity / S. H. Rosenhoff, E. Brooks, F. Bostick // Biochem. Pharmacol. – 1975. – Vol. 24. – P. 1898–1901.

11. L'Ecuyer, T. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death / T. L'Ecuyer, S. Sanjeev, R. Thomas // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2006. – Vol. 291, N 3. – P. 1273–1280.

12. Akao, M. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells / M. Akao, A. Ohler, B. O'Rourke // Circ. Res. – 2001. – Vol. 22, N 88. – P. 1267–1275.

13. Akao, M. Differential actions of cardioprotective agents on the mitochondrial death pathway / M. Akao, B. O'Rourke, H. Kusuoka // Circ. Res. – 2003. – Vol. 7, N 92. – P. 195–202.

14. Xu, X. Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron / X. Xu, H. L. Persson, D. R. Richardson // Mol. Pharmacol. – 2005. – Vol. 68, N 2. – P. 261–271.

15. Shi, J. Apoptosis in Anthracycline Cardiomyopathy / J. Shi, E. Abdelwahid, L. Wei // Curr. Pediatr. Rev. – 2011. – Vol. 7, N 4. – P. 329–336.

16. Boucek, R. J. J. Persistant effects of doxorubicin on cardiac gene expression / R. J. J. Boucek, A. Miracle, M. Anderson // J. Mol. Cell Cardiol. – 1999. – Vol. 31. – P. 1435–1446.

17. Yin, X. Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart / X. Yin, H. Wu, Y. Chen // Biochem. Pharmacol. – 1998. – Vol. 56, suppl. 1. – P. 87–93.

18. Creutzig, U. Longitudinal evaluation of early and late anthracycline cardiotoxicity in children with AML / U. Creutzig, S. Diekamp, M. Zimmermann // Pediatr. Blood Cancer. – 2007. – Vol. 48. – P. 651–662.

19. Розенберг, В. Д. Дилатационная кардиомиопатия: Общая патология и патоморфология / В. Д. Розенберг, Л. М. Непомнящих. – М.: Изд-во РАМН, 2004. – 352 с.

20. Технический кодекс установившейся практики. ТКП 125-2008 (02040). Надлежащая лабораторная практика: постановление Министерства здравоохранения Респ. Беларусь, 28 марта 2008 г., № 56.

21. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986; Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Strasbourg, 22 June 1998.

22. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin / S. Zhou [et al.] // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 771–777.

23. Боголепов, Н. Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга / Н. Н. Боголепов. – М., 1976. – 71 с.

References

1. Chernova V. A. *Lekarstvennye i diagnosticheskie sredstva, primenyaemye v onkologicheskoi praktike* [Medicines and diagnostic tools used in oncological practice], Medicine, Moscow, RU, 1982.

2. Lushnikova E. L., Nepomnyashchikh L. M., Rozenberg V. D. *Morfologicheskie i molekulyarno-geneticheskie osnovy dilatatsionnoi kardiomiopatii* [Morphological and molecular-genetic bases of dilatation cardiomyopathy], Publ. of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, RU, 2004.

3. Doroshow J. H. "Doxorubicin-induced cardiac toxicity", *New England Journal of Medicine*, 1991, vol. 21, pp. 843–845.

4. Hanai K., Takaba K., Manabe S., Nakano M., Kohda A., Matsuo M. "Evaluation of cardiac function by echocardiography in dogs treated with doxorubicin", *Journal of Toxicological Sciences*, 1996, vol. 21, no. 1, pp. 1–10.

5. Grenier M. A., Lipshultz S. E. “Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children, adults”, *Seminars in Oncology*, 1998, vol. 25, suppl. 10, pp. 72–85.

6. Ferrans V. J., Clark J. R., Zhang Jun, Yu Z. X., Herman E. H. “Pathogenesis, prevention of doxorubicin cardiomyopathy”, *Tsitologiia*, 1997, vol. 39, no. 10, pp. 928–937.

7. Lewis W., Kleinerman J., Puszkin S. “Interaction of adriamycin in vitro with cardiac myofibril proteins”, *Cancer Research*, 1982, vol. 50, pp. 547–553.

8. Olson R. D., Mushlin P. S., Breuner D. E., Fleischer S., Cusack B. J., Chang B. K., Boucek R. J. “Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite, doxorubicinol”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, vol. 85, pp. 3585–3589.

9. Sacco G., Giampietro R., Salvatorelli E., Menna P., Bertani N., Graiani G., Animati F., Goso C., Maggi C. A., Manzini S., Minotti G. “Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites, reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation, reactivity”, *British Journal of Pharmacology*, 2003, vol. 139, no. 3, pp. 641–651.

10. Rosenoff S. H., Brooks E., Bostick F., Young R. C. “Alteration in DNA synthesis in cardiac tissues induced by adriamycin in vivo-relationship to fatal toxicity”, *Biochemical Pharmacology*, 1975, vol. 24, pp. 1898–1901.

11. L’Ecuyer T., Sanjeev S., Thomas R., Novak R., Das L., Campbell W., Heide R. V. “DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death”, *American journal of physiology. Heart, circulatory physiology*, 2006, vol. 291, no. 3, pp. 1273–1280.

12. Akao M., Ohler A., O’Rourke B., Marbán E. “Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells”, *Circulation Research*, 2001, vol. 22, no. 88 (12), pp. 1267–1275.

13. Akao M., O’Rourke B., Kusuoka H., Teshima Ya., Jones S. P., Marbán E. “Differential actions of cardioprotective agents on the mitochondrial death pathway”, *Circulation Research*, 2003, vol. 7, no. 92 (2), pp. 195–202.

14. Xu X., Persson H. L., Richardson D. R. “Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron”, *Molecular Pharmacology*, 2005, vol. 68, no. 2, pp. 261–271.

15. Shi J., Abdelwahid E., Wei L. “Apoptosis in Anthracycline Cardiomyopathy”, *Current Pediatric Reviews*, 2011, vol. 7, no. 4, pp. 329–336.

16. Boucek R. J. J., Miracle A., Anderson M., Engelman R., Atkinson J., Dodd D. A. “Persistant effects of doxorubicin on cardiac gene expression”, *Journal of Molecular, Cellular Cardiology*, 1999, vol. 31, pp. 1435–1446.

17. Yin X., Wu H., Chen Y., Kang Y. J. “Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart”, *Biochemical Pharmacology*, 1998, vol. 56, suppl. 1, pp. 87–93.

18. Creutzig U., Diekamp S., Zimmermann M., Reinhardt D. “Longitudinal evaluation of early, late anthracycline cardiotoxicity in children with AML”, *Pediatric Blood, Cancer*, 2007, vol. 48, pp. 651–662.

19. Rosenberg V. D., Nepomnyashchikh L. M. *Dilatatsionnaya kardiomiopatiya: Obshchaya patologiya i patomorfologiya* [Dilation cardiomyopathy: general pathology and pathomorphology], Publ. of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, RU, 2004.

20. Health Ministry of the Republic of Belarus, *TKP 125-2008 (02040): Nadlezhashchaya Laboratornaya Praktika* [TKP 125-2008 (02040): Good Laboratory Practice], BY, 2008.

21. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986*; Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental, other Scientific Purposes, Strasbourg, 22 June 1998.

22. Zhou S., Starkov A., Froberg M. K., Leino L. R., Wallace B. K. “Cumulative, irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin”, *Cancer Research*, 2001, vol. 61, pp. 771–777.

23. Bogolepov N. *Metody elektronno-mikroskopicheskogo issledovaniya mozga* [Methods of electron microscopic study of brain], Moscow, RU, 1976.

Информация об авторах

Арчакова Людмила Ивановна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник, профессор. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: biblio@fizio.bas-net.by

Новаковская Светлана Алексеевна – ст. науч. сотрудник, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: novakovskaya@tut.by

Information about the authors

Archakova Ludmila Ivanovna – D. Sc. (Biol.), Chief researcher, Professor. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: biblio@fizio.bas-net.by

Novakovskaya Svetlana Alekseevna – Senior researcher, Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: novakovskaya@tut.by

Для цитирования

Арчакова, Л. И. Клеточные механизмы антрациклиновой кардиомиопатии при действии антибиотика доксорубицина / Л. И. Арчакова, С. А. Новаковская // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 83–89.

For citation

Archakova L. I., Novakovskaya S. A. “Cell mechanisms of antracycline cardiomyopathy under antibiotic doxorubicin treatment”. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 83–89.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК [616.33-002.2:616.33-007.7-008.9-092.18]:616-007.17]-053.5/.7
Поступила в редакцию 29.06.2015
Received 29.06.2015

Я. Р. Мацюк, Н. С. Парамонова, А. А. Карчевский, О. В. Барабан

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

МОРФО-ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКЗОКРИНОЦИТОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ НА ФОНЕ ДИСПЛАЗИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

С помощью гистологических и гистохимических методов проведено комплексное исследование биоптатов донного и пилорического отделов желудка детей 6–18-летнего возраста, страдающих хроническим гастритом и хроническим гастритом на фоне дисплазии соединительной ткани. Выполнен морфометрический, цитофотометрический и статистический анализ полученных данных. Установлено, что дисплазия соединительной ткани усугубляет течение хронического гастрита, вызывает деструктивные изменения поверхностно-ямочного эпителия, особенно в донном отделе, снижение в них активности сукцинатдегидрогеназы (без существенного изменения активности лактатдегидрогеназы), повышение активности НАДН-дегидрогеназы и кислой фосфатазы, а также угнетение синтеза мукополисахаридов, что приводит к уменьшению их количества не только в эпителиоцитах, но и в поверхностной слизи. Изменения в главных и особенно в париетальных экзокриноцитах менее выражены. Снижение защитного барьера слизистой оболочки при наличии агрессивных ферментов желудочного сока приводит к более частому развитию эрозий, а иногда и язв у детей с хроническим гастритом, развивающимся на фоне дисплазии соединительной ткани.

Ключевые слова: дети, желудок, хронический гастрит, дисплазия соединительной ткани.

Ya. R. Matsiuk, N. S. Paramonava, A. A. Karcheuski, O. V. Baraban

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

MORPHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF EXOCRINE CELLS OF THE GASTRIC MUCOSA IN CHILDREN WITH CHRONIC GASTRITIS AT THE DYSPLASIA OF THE CONNECTIVE TISSUE

The aim of this study was to investigate the activity of succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, NADH-dehydrogenase, and acid phosphatase in biopsies of the bottom and pyloric parts of the stomach in children (6-18 years of age) with chronic gastritis and chronic gastritis at the dysplasia of the connective tissue. Histological and histochemical methods, morphometry, cytophotometry and statistical analysis were used.

It was found that the connective tissue dysplasia causes destructive changes in simple columnar epithelium, especially in the bottom part, with inhibition of the synthesis of mucopolysaccharides, which leads to a reduction in the number of epithelial cells not only in the simple columnar, but also in the mucus. Changes in the main and, especially, parietal exocrine cells are less pronounced. So, reducing the mucosal barrier in the presence of aggressive factors juice in children with chronic gastritis at the dysplasia of the connective tissue leads to a higher incidence of erosion and sometimes ulcers with increasing disease severity.

Keywords: children, stomach, chronic gastritis, connective tissue dysplasia.

Введение. Из всех болезней верхних отделов пищеварительного тракта хронический гастрит (ХГ) является наиболее распространенным гастроэнтерологическим заболеванием в детском возрасте: у детей младшего школьного возраста заболеваемость ХГ достигает 45 % среди всех болезней верхних отделов пищеварительного тракта, в среднем школьном возрасте – 73 %, у старших школьников – 65 % (снижение частоты этого заболевания с возрастом обусловлено увеличением доли язвенной болезни) [1]. За последние десятилетия частота встречаемости у детей тяжелых форм гастритов, сопровождающихся развитием множественных эрозий и субатрофий/атрофий слизистой оболочки желудка, заметно возросла [2, 3].

Поздняя диагностика ХГ во многом объясняется субклиническим течением болезни, частым вовлечением в патологический процесс других органов пищеварительной системы, а в ряде случаев – дисплазией соединительной ткани (ДСТ). В последнее время интерес к проблеме ДСТ резко возрос. Это вызвано изучением модифицирующего влияния данной патологии на характер течения практически всех заболеваний – от доброкачественных субклинических форм до полиорганной и полисистемной патологии, нередко не укладывающейся в представление ни об одном из известных моногенных заболеваний соединительной ткани (СТ). ДСТ (ранее в России приме-

нялись такие термины, как недифференцированная ДСТ, синдром ДСТ, мезенхимальная недостаточность и др.) – это гетерогенная группа заболеваний многофакторной природы, обусловленная вовлечением в патогенез общих ферментных систем и различных структурных белков внеклеточного матрикса СТ. В основе формирования данной патологии лежит сочетанное действие двух ведущих факторов: генетической предрасположенности, обусловленной суммирующим действием функциональных полиморфных аллелей большого числа генов и провоцирующим действием различных внешних факторов [4]. Высокая степень коллагенизации органов пищеварения приводит к полиморфизму клиники и проградиентности течения процессов со стороны желудка, кишечника и гепатобилиарной системы [5].

В связи с широкой распространенностью ХГ требует настойчивого изучения вопрос о роли ДСТ в течении и патогенезе этого заболевания с целью разработки высокоэффективных методов диагностики, лечения, особенно на начальных этапах заболевания, и выработке научно обоснованных подходов к управлению этой болезнью.

Цель исследования – определить с помощью гистологического и гистохимического методов с последующим морфометрическим, цитофотометрическим и статистическим анализом характер и выраженность морфофункциональных изменений в экзокриноцитах донного и пилорического отделов желудка у детей с хроническим гастритом и хроническим гастритом, развивающимся на фоне дисплазии соединительной ткани.

Материалы и методы исследования. Объект исследования – 60 детей в возрасте от 6 до 18 лет, находившихся на стационарном обследовании и лечении в 6-м отделении УЗ «Гродненская областная детская клиническая больница» по поводу гастродуоденальных заболеваний. Основную группу составили 40 детей с ХГ, протекающим на фоне ДСТ. В группу сравнения вошли 20 детей с ХГ без ДСТ.

Предмет исследования – биоптаты, полученные при эндоскопическом исследовании путем прицельной биопсии донного и пилорического отделов желудка детей, страдающих ХГ (группа сравнения) и ХГ, развившимся на фоне ДСТ (основная группа). ДСТ верифицировали по критериям Т. Милковска-Димитровой и А. Каркашева, в соответствии с которыми главными признаками ее развития являются плоскостопие, варикозное расширение вен, высокое нёбо, гипермобильность суставов, нарушения зрения, деформации грудной клетки и позвоночника, повышенная растяжимость кожи, арахнодактилия; второстепенными – аномалии ушных раковин, зубов, прикуса, преходящие суставные боли, вывихи и подвывихи суставов, птеригодактилия и др. [6].

Критериями включения в исследование являлись: возраст детей 6–18 лет; добровольное информированное согласие родителей на обследование ребенка, включая эндоскопическое с биопсией слизистой оболочки желудка; наличие ХГ; регулярное диспансерное наблюдение.

Критериями исключения были: органические заболевания кишечника; сопутствующие аллергические, иммунологические заболевания и патологии, способные оказать влияние на течение основного заболевания; прием в течение 4 недель антибактериальных и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств; нерегулярное диспансерное наблюдение и невыполнение рекомендаций лечащего врача.

Забор биоптатов производился в утренние часы с помощью фиброгастроскопа фирмы Olympus. Одну часть биоптатов после фиксации в жидкости Карнуа заключали в парафин с последующим монтированием в блоки по принципу «основная группа» и «группа сравнения». Изготовленные одномоментно парафиновые срезы толщиной 5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, использовали для гистологических исследований с последующей тщательной морфометрией, а срезы толщиной 10 мкм – для гистохимического определения в экзокриноцитах желудка локализации и содержания гликопротеинов (ГП) и сиаломуцинов (СМ). Другую часть биоптатов подвергали глубокому замораживанию в жидком азоте, а затем монтировали по тому же принципу на объектодержатели криостата фирмы Leica CM-1850 и изготавливали серийные срезы толщиной 10–15 мкм при температуре –15 °С. Криостатные срезы обрабатывали с целью определения активности оксидоредуктаз: связанных с циклом Кребса – сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (сукцинат: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1; по Нахласу, Цоу, Де Сюза, 1957); с гликолизом – лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (L – лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27; по Гесс, Скарпелли, Пирсу, 1958); с транспортом электронов – НАДН-дегидрогеназы (НАДН:

акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.6.99.3; по Нахласу, Уокеру и Зелигману, 1958); с кислой фосфатазой (КФ) – с маркерным ферментом лизосом (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.2; по Гомори (1950)). Все гистохимические реакции сопровождались безсубстратным контролем [7].

Проведенный комплекс гистологических и гистохимических исследований с последующим морфометрическим, цитофотометрическими и статистическим анализом, как нам представлялось, позволяет дифференцировать изменения, происходящие в экзокриноцитах слизистой оболочки донного и пилорического отделов желудка детей при «чистых» ХГ и гастритах, развивающихся на фоне ДСТ. При этом данные показатели весьма важны в оценке функционирования экзокриноцитов и желудка в целом. ГП и СМ – важные составные компоненты слизистого секрета, который образует защитный барьер и предохраняет слизистую оболочку от агрессивных ферментов желудочного сока. СДГ и НАДН-ДГ – митохондриальные ферменты, а ЛДГ – фермент гиалоплазмы. По их активности можно судить, по какому пути идет развитие энергетического механизма в экзокриноцитах – аэробному или затратному анаэробному. Это очень важно, так как секреторные процессы экзокриноцитов, особенно париетальных, сопровождаются большими энергетическими затратами. КФ – фермент лизосом, которые не только участвуют в утилизации измененных структур клетки, но и причастны к процессам внутриклеточной регенерации и адаптации клеток в целом.

Количественную оценку содержания в экзокриноцитах желудка ГП и СМ проводили визуально, а активность ферментов определяли цитофотометрически и выражали в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.). Морфометрические и цитофотометрические исследования осуществляли с помощью компьютерного анализатора изображения при разных увеличениях микроскопа Axioscop 2 plus (Carl Zeiss, Германия) и цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Германия), используя программу Image Warp (Bit Flow, США).

Полученный цифровой материал обрабатывали методами непараметрической статистики с применением компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows. В описательной статистике для каждого показателя определяли значение медианы (Me), а также нижнего и верхнего квартилей (25 %; 75 %). Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью *U*-критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Различия между показателями изучаемых групп считали достоверными, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. У страдающих ХГ детей, составляющих группу сравнения, однослойный столбчатый эпителий желудка отличался неоднородностью. В одних участках слизистой оболочки он набухший, переполненный секретом, содержащим ГП и СМ, в других он уплощен или отсутствовал вследствие десквамации, при этом собственная пластинка слизистой оболочки, инфильтрированной лимфоцитами, плазмоцитами, реже эозинофилами, обнажена. В таких участках при снижении содержания ГП и СМ или их отсутствии наблюдались эрозии, заполненные клеточным детритом или грануляционной тканью. В прилежащей к эрозиям рыхлой соединительной ткани слизистой оболочки наблюдалась разная по выраженности фибробластическая пролиферация.

Шеечные экзокриноциты собственных и пилорических желез, как главные и париетальные, характеризовались снижением их тинкториальных свойств. Среди шеечных экзокриноцитов иногда встречались митотически делящиеся формы. Париетальные экзокриноциты отличались полиморфизмом и микровакуолизированной цитоплазмой. В главных экзокриноцитах, особенно при поверхностных гастритах, эрозивных поражениях слизистой оболочки, имело место снижение базофильных свойств, сопровождаемое иногда потерей полярности. Мукоциты собственных и пилорических желез, как правило, переполнены секретом, содержащим ГП.

У детей, страдающих ХГ в сочетании с ДСТ, картина структурных и цитохимических изменений в слизистой оболочки желудка была более разнообразной по степени выраженности. Увеличилось количество участков в слизистой оболочке с уплощенным и десквамированным эпителием, а ввиду отсутствия в эпителиоцитах ГП и СМ снизился защитный барьер, что привело к более частому развитию эрозий, реже – язв. Высота эпителиоцитов в донном и пилорическом отделах, по данным морфометрии, уменьшена (табл. 1), а их содержание в комплексе Гольджи, особенно в донном отделе вновь синтезированных гранул ГП, снижено. Количество этих биополимеров уменьшилось и в поверхностной слизи, что свидетельствует о снижении защитного барьера слизи-

стой оболочки. Этому способствовало очаговое уменьшение или исчезновение в однослойном столбчатом эпителии, мукоцитах донных и пилорических желез содержания СМ как представителей гликозаминогликанов. Последние, наряду с ГП, образуют водонерастворимое вискозное покрытие слизистой оболочки желудка, которое препятствует проникновению обратно в слизистую водородных ионов, воздействию протеолитических ферментов желудочного сока и способствует удержанию секретируемых эпителиоцитами бикарбонатов**.**

Париетальные экзокриноциты собственных желез пациентов этой группы отличались полиморфизмом, зачастую микровакуолизированной цитоплазмой и разной степенью выраженности оксифильных свойств. По результатам морфометрических исследований, имело место достоверное уменьшение не только периметра, площади, но и объема клеток и их ядер. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в клетках было увеличено (табл. 1). Представленные данные в совокупности свидетельствуют о более низкой дифференцированности функциональной активности париетальных экзокриноцитов у пациентов этой группы. Главные экзокриноциты, у которых хотя и проявлялась тенденция к увеличению высоты, отличались неодинаковой степенью выраженности базофильных свойств. У клеток со сниженными тинкториальными свойствами, как правило, отсутствовала полярность. Низкое содержание секреторных гранул в апикальном отделе обусловлено экструзией. Хроматин в их ядрах становился крупноглыбчатым, с периферической локализацией в кариоплазме. Ядрышки в ядрах главных клеток выделялись не отчетливо, как и их фибриллярный и гранулярный компоненты. Практически аналогичная, но сравнительно менее выраженная картина изменений наблюдалась в эпителиоцитах пилорического отдела. В его концевых отделах имело место тенденция к уменьшению высоты мукоцитов.

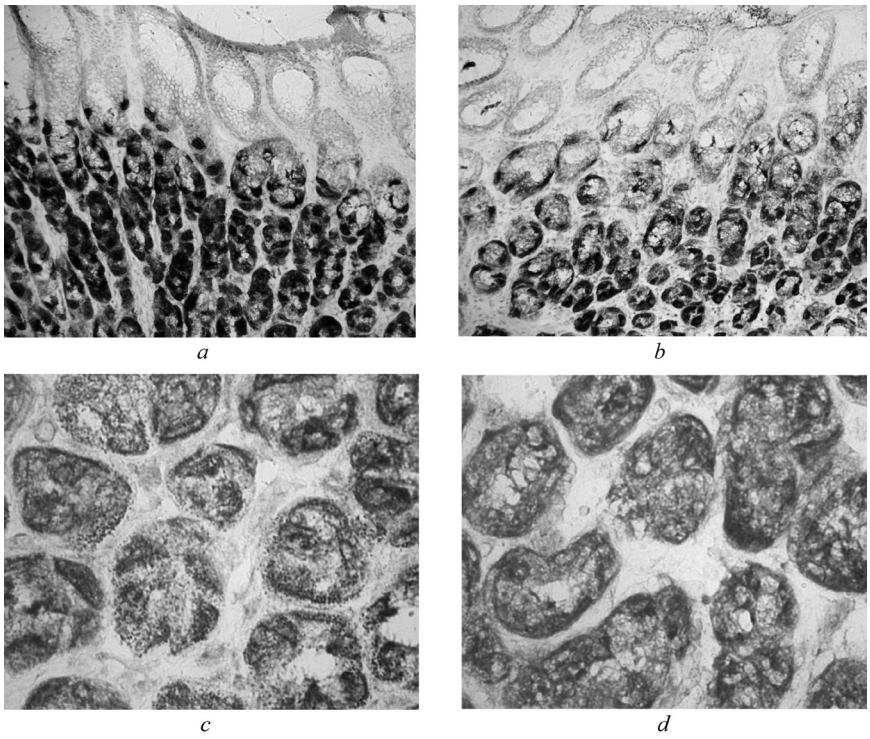
Т а б л и ц а 1. **Структурные показатели экзокриноцитов донного и пилорического отделов желудка у детей с ХГ и с ХГ на фоне ДСТ по данным морфометрии, Me (LQ/UQ)**

T a b l e 1. **Structural indices of exocrine cells of the bottom and pyloric parts of the stomach in children with chronic gastritis and chronic gastritis at the connective tissue dysplasia according to morphometry data, Me (LQ/UQ)**

Показатель	Группа сравнения	Основная группа
Высота однослойного столбчатого эпителия дна желудка, мкм	14 (10/16)	9 (8/12)***
Высота ямочного столбчатого эпителия дна желудка, мкм	17 (16/19)	16 (14/17)***
Периметр париетальной клетки, мкм	56,49 (52,39/60,62)	49,19 (44,83/53,47)***
Площадь париетальной клетки, мкм^2	215 (177,93/235,66)	146,22 (125,77/179,2)***
Объем париетальной клетки, мкм^3	2371,49 (1785,41/2721,4)	1330,07 (1061,04/1804,56)***
Периметр ядра париетальной клетки, мкм	20,68 (18,56/22,33)	19,08 (17,48/20,43)***
Площадь ядра париетальной клетки, мкм^2	28,59 (23,07/33,41)	23,04 (19,83/28,03)***
Объем ядра париетальной клетки, мкм^3	113,69 (85,41/147,3)	89,11 (70,48/111,84)***
Ядерно-цитоплазмотическое отношение париетальной клетки	0,16 (0,13/0,2)	0,19 (0,14/0,14)**
Высота главных клеток донного отдела, мкм	12 (11/14)	15 (14/16)***
Высота поверхностного однослойного столбчатого эпителия пилорического отдела, мкм	14 (12/17)	10 (9/12)***
Высота ямочного столбчатого эпителия пилорического отдела, мкм	18 (17/18)	18 (15/20)
Высота экзокриноцитов пилорических желез, мкм	16 (14,5/18,5)	15 (13/17)

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий: ** – $p < 0{,}01$, *** – $p < 0{,}001$.

Анализ данных, представленных в табл. 1, показал достоверное уменьшение в основной группе высоты поверхностного и ямочного столбчатого эпителия в донном и пилорическом отделах. Содержание в нем, как и в мукоцитах донных и пилорических желез, ГП и СМ снижено, иногда последние совсем не выявлялись. Изложенные выше данные свидетельствуют о снижении у пациентов этой группы защитного барьера слизистой оболочки желудка, что способствовало эрозивному и язвенному поражению слизистой оболочки. Увеличение высоты главных экзокриноцитов, уменьшение базофильных свойств цитоплазмы и отсутствие в ее апикальном отделе секреторных гранул, как предполагается, способствует увеличению экструзии пепсиногена в полость желудка. Наличие в париетальных экзокриноцитах микровезикул свидетельствует о расширении внутриклеточных секреторных канальцев, обусловленном выполнением ими кислотообразующей функции.



Общий вид активности СДГ (*a*) и ЛДГ (*c*) в экзокриноцитах желудка детей, страдающих ХГ, и уменьшение ее в экзокриноцитах (*b*, *d*) желудка детей, болеющих ХГ в сочетании с ДСТ. Окраска на выявление СДГ по Нахласу и др. (1957), на выявление ЛДГ – по Гесс и др. (1958). Увеличение: *a*, *b* – ×100, *c*, *d* – ×400

The general activity of SDH (*a*) and LDH (*c*) in the exocrine cells of the stomach of children with chronic gastritis and its decrease in the exocrine cells (*b, d*) of the stomach of children with chronic gastritis at the connective tissue dysplasia. A larger decrease is seen in SDH (*b*) than in LDH (*d*). The SHD color is found according to Nakhlas et al. (1957), the LDH color – according to Hess et al. (1958). Magnification: *a*, *b* – ×100, *c*, *d* – ×400

Неоднозначны у пациентов с ХГ на фоне ДСТ и цитохимические изменения активности ферментов в экзокриноцитах желудка. Последние заметны даже при беглом просмотре препаратов (см. рисунок). На рисунке видно, что в экзокриноцитах пациентов основной группы при сопоставлении с таковыми группы сравнения снижение активности СДГ более заметно, нежели снижение активности ЛДГ.

Применение цитофотометрического метода исследования дало возможность определить количественные параметры изменяющейся активности ферментов в экзокриноцитах донного и пилорического отделов желудка пациентов с ХГ на фоне ДСТ и сравнить их с таковыми у детей с ХГ без дисплазии (табл. 2).

Как показал анализ данных табл. 2, при наличии ДСТ у пациентов, страдающих ХГ, в поверхностно-ямочных столбчатых эпителиоцитах донного отдела желудка активность СДГ снизилась на 54,4 %, а активность ЛДГ практически не изменилась. Активность же НАДН-ДГ в эпителиоцитах и особенно КФ, наоборот, возросла – на 16,2 и 33,9 % соответственно. Более значимое снижение СДГ по сравнению ЛДГ имело место и в главных экзокриноцитах. Активность в них КФ, НАДН-ДГ, наоборот, возросло – на 66,4 и 38,1 % соответственно. По сравнению с поверхностно-ямочным столбчатым эпителием и главными экзокриноцитами в париетальных экзокриноцитах из-за высокого объемного содержания в цитоплазме митохондрий активность СДГ снизилась незначительно (на 12,4 %). Несущественным было также снижение ЛДГ. Активность КФ возросла весьма значимо – на 56,1 %.

В пилорическом отделе характер изменения активности ферментов был несколько иным, чем в донном. Активность СДГ, ЛДГ в поверхностно-ямочном эпителии, наоборот, статистически значимо возросла (на 25,8 и 21,2 % соответственно). Следует отметить также, что уменьшение в эпителии пилорического отдела желудка содержания ГП было менее выраженным, нежели

Т а б л и ц а 2. **Активность ферментов в экзокриноцитах донного и пилорического отделов желудка детей, страдающих ХГ (группа сравнения) и ХГ в сочетании с ДСТ (основная группа) по данным цитофотометрии, ед. опт. пл., Me (25 %; 75 %)**

T a b l e 2. **Ferment activity in the exocrine cells of the bottom and pyloric parts of the stomach of children with chronic gastritis (comparison group) and with chronic gastritis at the connective tissue dysplasia (main group) according to the cytophotometry data, optic density units, Me (25 %; 75 %)**

Ферменты	Группа сравнения	Группа основная
Донный отдел		
Цитоплазма поверхностно-ямочных столбчатых эпителиоцитов:		
СДГ	0,160 (0,109; 0,178)	0,073 (0,051; 0,110)***
НАДН-ДГ	0,313 (0,232; 0,393)	0,364 (0,294; 0,416)
ЛДГ	0,244 (0,213; 0,285)	0,222 (0,162; 0,261)
КФ	0,059 (0,038; 0,076)	0,079 (0,064; 0,106)***
Цитоплазма главных экзокриноцитов:		
СДГ	0,390 (0,327; 0,445)	0,227 (0,176; 0,327)***
НАДН-ДГ	0,291 (0,246; 0,331)	0,402 (0,328; 0,473)***
ЛДГ	0,239 (0,194; 0,275)	0,218 (0,192; 0,241)
КФ	0,232 (0,190; 0,263)	0,386 (0,319; 0,488)***
Цитоплазма париетальных экзокриноцитов:		
СДГ	0,645 (0,589; 0,702)	0,565 (0,508; 0,618)***
НАДН-ДГ	0,621 (0,570; 0,665)	0,656 (0,607; 0,714)*
ЛДГ	0,375 (0,343; 0,402)	0,366 (0,332; 0,410)
КФ	0,139 (0,105; 0,199)	0,217 (0,159; 0,268)***
Пилорический отдел		
Цитоплазма поверхностно-ямочных столбчатых эпителиоцитов:		
СДГ	0,062 (0,053; 0,079)	0,078 (0,061; 0,095)*
НАДН-ДГ	0,375 (0,330; 0,399)	0,439 (0,382; 0,509)***
ЛДГ	0,208 (0,155; 0,245)	0,252 (0,206; 0,294)***
КФ	0,049 (0,040; 0,055)	0,067 (0,047; 0,082)***
Цитоплазма слизистых клеток (мукоцитов):		
СДГ	0,132 (0,114; 0,162)	0,163 (0,108; 0,201)
НАДН-ДГ	0,467 (0,390; 0,533)	0,498 (0,450; 0,542)
ЛДГ	0,230 (0,207; 0,262)	0,282 (0,235; 0,314)***
КФ	0,029 (0,022; 0,067)	0,063 (0,033; 0,083)*

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий: * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$.

в донном. Оставалась увеличенной в эпителиоцитах активность НАДН-ДГ и КФ (на 17,1 и 36, % соответственно). В мукоцитах пилорических желез возросла активность ЛДГ (на 22,6 %). Активность же СДГ, НАДН-ДГ статистически не отличалась от таковой в группе сравнения. В цитоплазме мукоцитов основной группы наблюдалось статистически значимое (на 117,2 %) повышение активности КФ.

Выводы

1. Дисплазия соединительной ткани усугубляет течение ХГ. Отмечается уменьшение высоты эпителиального покрова, особенно в донном отделе, вплоть до уплощения и десквамации с обнажением собственной пластинки слизистой оболочки.

2. В цитоплазме эпителиоцитов донного отдела наблюдается снижение активности СДГ при существенной неизменяемости активности ЛДГ, что свидетельствует об угнетении в эпителиоцитах энергетического механизма и переключения его с аэробного на неэкономный анаэробный способ. Создающийся энергетический дефицит тормозит синтетические процессы в эпителиоцитах в плане образования в них гликопротеинов и сиаломуцинов.

3. Уменьшение содержания гликопротеинов и сиаломуцинов в однослойном столбчатом эпителии и поверхностной слизи способствует снижению защитных свойств слизистого барьера.

4. Изменения структурных и цитохимических свойств главных и особенно париетальных экзокриноцитов менее выражены. Незначительное уменьшение активности СДГ при практически неизменяемости активности ЛДГ свидетельствует о менее глубоких нарушениях энергетического механизма, дающих возможность поддержать их ферментно- и кислотообразующую функции.

5. У детей, страдающих ХГ на фоне ДСТ, одним из патогенетических механизмов развития патологического процесса в слизистой оболочке желудка является снижение ее защитных свойств при сохранении, учитывая структуру главных и париетальных экзокриноцитов, агрессивных ферментов желудочного сока, что способствует развитию эрозивных поражений.

Список использованных источников

1. Гастроэнтерология детского возраста / под ред. С. В. Бельмера, А. И. Хавкина, П. Л. Щербакова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2010. – 476 с.

2. Cam, S. Risk of gastric cancer in children with *Helicobacter pylori* infection / S. Cam // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2014. – Vol. 22, N 15. – P. 9905–9908.

3. Villarreal-Calderon, R. Antral atrophy, intestinal metaplasia, and preneoplastic markers in Mexican children with *Helicobacter pylori*-positive and *Helicobacter pylori*-negative gastritis / R. Villarreal-Calderon [et al.] // Ann. Diagn. Pathol. – 2014. – Vol. 3, N 18. – P. 129–135.

4. Наследственные и многофакторные нарушения соединительной ткани у детей: алгоритмы диагностики, тактика ведения // Журн. «Педиатрия» имени Г. Н. Сперанского. – Приложение. – 2014. – Т. 93, № 5. – С. 1–40.

5. Трутнева, Л. А. Особенности гастродуоденальных заболеваний у детей с недифференцированной дисплазией соединительной ткани / Л. А. Трутнева, В. В. Чемоданов // Педиатрия. – 2010. – № 2. – С. 12–17.

6. Милковска-Дмитрова, Т. Врожденная соеденительнотканна малостойкость у децата / Т. Милковска-Дмитрова. – София: Медицина и физкультура, 1987. – С. 189.

7. Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – М.: Иностр. лит., 1962. – 962 с.

References

1. Belmer S. V., Khavkin A. I., Shcherbakov P. L. (ed.). *Gastroenterologiya detskogo vozrasta* [Pediatric gastroenterology], 2nd ed., Medpraktika-M, Moscow, Russia, 2010.

2. Cam S. “Risk of gastric cancer in children with *Helicobacter pylori* infection”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, vol. 22, pp. 9905–9908.

3. Villarreal-Calderon R. “Antral atrophy, intestinal metaplasia, preneoplastic markers in Mexican children with *Helicobacter pylori*-positive, *Helicobacter pylori*-negative gastritis”, *Annals of Diagnostic Pathology*, 2014, vol. 3, pp. 129–135.

4. “Heritable and many-factor disorders of the connective tissue of children: diagnosis algorithms, management”, *Zhurnal «Pediatriya» imeni G. N. Speranskogo* [Journal “Pediatria” named after G. N. Speransky], 2014, vol. 93. no. 5, pp. 1–40.

5. Trutneva L. A., Chemodanov V. V. “Features of gastroduodenal diseases of children with non-differentiated dysplasia of the connective tissue”, *Zhurnal «Pediatriya» imeni G. N. Speranskogo* [Journal “Pediatria” named after G. N. Speransky], 2010, vol. 89, no. 2, pp. 12–17.

6. Milkovska-Dmitrova T. *Vrozhdenna soedinitel’no-tkanna malostoikost’ u detsata* [Small congential stability of the connective tissue of children congential stability of the connective tissue of children], Medical, Training, Sofia, BG, 1987.

7. Pirs E. *Gistokhimiya teoreticheskaya i prikladnaya* [Gystochemistry, theoretical and applied], Inostrannaya literatura, Moscow, Russia, 962 p.

Информация об авторах

Мацюк Ярослав Романович – д-р биол. наук, профессор. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: matsiuk39@mail.ru

Парамонова Нэлла Сергеевна – д-р мед. наук, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: ped2@grsmu.by

Карчевский Андрей Алексеевич – ассистент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: Akarcheuski@Gmail.com

Барабан Ольга Викторовна – канд. биол. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: zimatkin@grsmu.by

Для цитирования

Морфо-гистохимическая характеристика экзокриноцитов слизистой оболочки желудка у детей с хроническим гастритом на фоне дисплазии соединительной ткани / Я. Р. Мацюк [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 90–96.

Information about the authors

Matsiuk Yaroslav Romanovich – D. Sc. (Biol.), Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: matsiuk39@mail.ru

Paramonava Nella Sergeevna – D. Sc. (Med.), Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: ped2@grsmu.by

Karcheuski Andrey Alekseevich – Assistant. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: Akarcheuski@Gmail.com

Baraban Ol’ga Victorovna – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: zimatkin@grsmu.by

For citation

Matsiuk Ya. R., Paramonava N. S., Karcheuski A. A., Baraban O. V. “Morpho-histochemical characteristics of exocrine cells of the gastric mucosa in children with chronic gastritis with dysplasia of connective tissue”. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 90–96.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 576.31:616.155-006:616.523

Поступила в редакцию 02.11.2016
Received 02.11.2016

Т. В. Жукова[1], А. Ф. Смеянович[2], С. Д. Безубик[2], Я. О. Кузнецов[3]

[1]Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, Минск, Республика Беларусь
[2]Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Республика Беларусь
[3]5-я городская поликлиника, Минск, Республика Беларусь

МЕХАНИЗМЫ РОСТА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Высокозлокачественные нейроэпителиальные опухоли характеризуются преимущественной пролиферацией эндотелиальных клеток, что определяет первичность роста сосудов, являясь основным механизмом при опухолевой прогрессии.

Низкозлокачественные нейроэпителиальные опухоли характеризуются ростом опухолевой массы за счет увеличения клеточной популяции. При увеличении численности клеток в 2 раза образуется пролиферирующий сосуд, что увеличивает степень агрессивности опухолевого процесса.

Нейроэпителиальные опухоли контаминированы вирусом простого герпеса (ВПГ) на 92–93 %. В этиопатогенезе данного процесса лежит продуктивное воспаление, характеризующееся Т-лимфоцитарной инфильтрацией, являющейся ключевым звеном клеточной пролиферации.

Нейроэпителиальные опухоли, протекающие на фоне воспалительного процесса, вызванного ВПГ, имеют различную степень агрессивности течения заболевания в зависимости от наличия признаков обострения продуктивного воспаления.

Взаимодействие вирусного генома с опухолевой тканью заключается в том, что контаминация высокозлокачественных нейроэпителиальных опухолей ВПГ увеличивает количество антиапоптозного фактора (bcl-2) эндотелиальной клетки в среднем в 3 раза. Контаминация низкозлокачественных нейроэпителиальных опухолей ВПГ увеличивает количество антиапоптозного фактора опухолевой клетки (bcl-2) в среднем в 2 раза. Количество эпидермального фактора роста увеличивается в среднем в 2,5 раза во время репликации вируса, проявляющегося у опухолей всех групп в виде клинико-морфологических признаков обострения хронического воспаления.

Увеличение количества вновь образованных сосудов в нейроэпителиальной опухоли является неблагоприятным фактором и указывает на более ранее возникновение рецидива (продолженного роста) в случае нейроэпителиальных опухолей. Для анапластической астроцитомы оно составляет 25 и более, для анапластической олигодендроглиомы – 26 и более, для глиобластомы – 37 и более в поле зрения при 400-кратном увеличении.

Ключевые слова: нейроэпителиальные опухоли, механизмы роста.

T. Zhukova[1], A. Smeyanovich[2], S. Bezubik[2], O. Kyznetsov[3]

[1]Republic Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics, Minsk, Republic of Belarus
[2]Republic Scientific and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Republic of Belarus
[3]5th City Polyclinic, Minsk, Republic of Belarus

MECHANISMS OF GROWTH OF TRANSFORMED NEUROEPITHELIAL TUMORS

High malignant neuroepithelial tumors are characterized by a cascade growth that features primarily the growth of tumor vessels to periphery with an involvement of tumor cells in process. With the expansion of their population by a factor of 2, a new tumor vessel appears outside the main tumor node.

Low malignant neuroepithelial tumors are characterized by the growth of tumor mass by means of the cell population. With the two-fold rise of the cell amount, a new proliferating vessel appears which increases the stage of tumor malignancy.

Neuroepithelial tumors are contaminated by HSV in 92–93 % of all cases that is manifestated by inflammation.

The patients with neuroepithelial tumors growing on the background of the inflammatory process caused by HSV have different degrees of aggressiveness of the disease depending on the presence or absence of exacerbation signs.

Contamination of neuroepithelial tumors by HSV increases a proliferative activity of tumor cells due to increase in the amount of anti-apoptosis factor (bcl-2), two times, the endothelium of vessels three times and also increases the amount of the endothelial growth factor which is directly proportional to the expression of antibody HSV during viral replication that is accompanied by exacerbation of chronical inflammation, on which tumors are growing.

Neuroepitelhial tumors recur on the background of exacerbation of chronic inflammation in the interval: glyoblastomas – 3 to 6 months, anaplastical astrocytomas and olygodendroglyomas and ependimomas – 6 to 9 months, astrocytomas and oligodendroglyomas – 18 to 24 months.

The increase in the amount of newly formed blood vessels is the unfavorable factor and points to more early beginnings of relapse in case ofneuroepitelial tumors. For anaplastic astrocitomas, it is 25 and more, for anaplastic oligodendrogliomas – 26 and more, for glioblastomas – 37 and more.

Keywords: neuroepithelial tumors, mechanism of growth.

Введение. Злокачественные новообразования возникают в результате неограниченной пролиферации клеток. Возникший клон выходит за пределы собственной ткани и способен к росту на других «территориях». При этом в популяции его клеток постоянно возникают и отбираются все более автономные и агрессивные субклоны. Такое поведение клеточного клона называется опухолевой прогрессией [1, 2].

В последнее десятилетие достигнуты значительные успехи в идентификации генов, нарушения функции которых приводят к развитию опухолей. Ведутся серьезные исследования по выяснению роли белковых продуктов таких генов в физиологии клетки. В настоящее время доказана роль многих вирусных геномов и их белковых частиц в приобретении клеткой свойств, способствующих ее опухолевому перерождению [3, 4]. Большинство типов нормальных клеток способны размножаться лишь при условии их прикрепления к определенному внеклеточному матриксу, поэтому, например, продвижение эндотелиальной клетки из основного опухолевого узла, способствующее продолженному росту нейроэпителиальной опухоли, наводит на мысль об изменении ее генетического материала. Такой измененный материал, соответственно, преобразует свойства глии, которая становится доступной для единственной эндотелиальной клетки, относящейся к опухолевому сосуду. Нормальные эндотелиоциты размножаются до тех пор, пока не возникнет плотный монослой и не установятся межклеточные контакты. При возникновении межклеточных контактов пролиферация трансформированных клеток не останавливается и они продолжают делиться, наползать друг на друга, образуя участки многослойного роста [1, 3, 5].

Цель исследования – изучить влияние трансформации на основные факторы роста высокозлокачественных и низкозлокачественных нейроэпителиальных опухолей.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования послужили текущие и архивные биопсии 1424 нейроэпителиальных опухолей, контаминированных вирусом простого герпеса (ВПГ). Исследованы глиальные опухоли разной степени злокачественности, поскольку они наиболее удобны для статистической обработки: глиобластомы (n = 748), анапластические астроцитомы (n = 103), астроцитомы (n = 248), олигодендроглиомы (n = 126), анапластические олигодендроглиомы (n = 25), смешанные глиомы (n = 60), анапластические смешанные глиомы (n = 15), эпендимомы (n = 85), анапластические эпендимомы (n = 14). Другие нейроэпителиальные опухоли встречались в единичных случаях. Контрольные группы составили опухоли, которые не экспрессировали антитела к ВПГ и в которых не выявлялись внутриядерные включения, характерные для ВПГ (для глиобластом – 58 опухолей, для анапластических астроцитом – 10, для астроцитом – 20, для олигодендроглиом – 10, для олигоастроцитом – 8, для эпендимом – 8). Анапластические олигоастроциты и эпендимы контрольных групп статистической обработке не подвергали ввиду их малочисленности (по 2 случая), используя их лишь для сравнения морфологических признаков. Для проведения морфологического исследования кусочки опухоли фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине и заключали в парафин. Толщина гистологических срезов составила 4 мкм. Все препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

Для выявления в опухолях ВПГ проводили иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с антителами к антигену ВПГ I и II типа. Наиболее современным является подход, основанный на ИГХ-анализе протеинов ядра, связанных с репликацией ДНК при помощи моноклональных антител к Ki-67. Последний является ядерным антигеном, присутствует в клетках во время активных фаз клеточного цикла (G1, S, G2 и M), но отсутствует в фазе G0 (фаза покоящихся клеток).

По результатам ИГХ-исследования установлено, что ядра окрашены в коричневый цвет ядер и имеют более интенсивное прокрашивание ядрышек, а также отчетливо выявляются митотические фигуры. Индекс пролиферативной активности (ИПА) определяли по экспрессии Ki-67 в 9 случайных полях зрения при большом увеличении (объектив ×40), подсчитывая общее число опухолевых клеток (не менее 100) и количество иммунопозитивных клеток к Ki-67 и определяя их процентное соотношение.

Для подсчета количества сосудов использовали моноклональные антитела к CD34, являющиеся иммуногистохимическим маркером эндотелиальных клеток. Экспрессию CD34 определяли по количеству четко окрашенных в коричневый цвет стенок сосудов, а также отдельно расположенных иммунореактивных эндотелиальных клеток коричневого цвета. Микрососуды, которые маркировались CD34, подсчитывали в наиболее васкуляризированных участках, так называемой «горячей точке», при большом увеличении микроскопа (×40). Каждую иммунореактивную эндотелиальную клетку считали исчисляемым сосудом. Для идентификации воспалительной инфильтрации проводили ИГХ-исследование с набором моноклональных антител CD45 (общий лейкоцитарный фактор), CD8 (Т-лимфоциты), CD20 (В-лимфоциты), а также Plasmosel. Для изучения апоптоза применялось ИГХ-исследование с p53 и bcl-2, являющимися факторами ускорения либо замедления апоптоза. Агрессивность роста опухолей изучали с помощью эпидермального фактора роста (EGFR, epidermal growth factor receptor).

Для проведения иммуногистохимического анализа использовали срезы с парафиновых блоков, предназначенных для стандартного морфологического исследования опухолей. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов срезы прогревали на водяной бане в предварительно нагретом до 95–99 °С буфере в течение 30 мин. Затем стекла охлаждали при комнатной температуре в течение 15–20 мин и переносили в фосфатный буфер на 5 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 10 мин в темноте с 3 %-ной перекисью водорода, приготовленной на дистиллированной воде, а затем промывали 5 мин в фосфатном буфере. Для блокировки неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 мин с 1 %-ным раствором бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию с первичными антителами проводили при 40 °С в течение 16 ч. После первичных антител стекла промывали 2 раза по 5 мин в фосфатном буфере. Инкубация с проявочной тест-системой проходила при комнатной температуре в течение 20 мин, затем срезы промывали 2 раза по 5 мин. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали DAB+ систему DAKO. Реакцию проводили в темноте в течение 5–10 мин. Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали под покровные стекла.

Результаты окрашивания оценивали с применением светового микроскопа Leica (Германия) при 100-, 200- и 400-кратном увеличении. Для всех маркеров определяли локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество.

Результаты и их обсуждение. Для высокозлокачественных нейроэпителиальных опухолей, к которым относятся глиобластома, анапластическая астроцитома, анапластическая олигодендроглиома, анапластическая олигоастроцитома и анапластическая эпендимома, был характерен этапный рост. Скорость роста определяло соотношение ростовых факторов (прежде всего апоптозного фактора p53 и антиапоптозного фактора bcl-2), индекс пролиферативной активности, а также количество сосудов в наиболее васкуляризированной («горячей») точке. Все перечисленные показатели для нейроэпителиальных опухолей, контаминированных ВПГ, были выше для опухолей, протекающих на фоне обострения хронического воспаления. Показатели роста высокозлокачественных опухолей приведены в табл. 1, 2.

Из табл. 1, 2 следует, что для глиобластомы, протекавшей на фоне хронического воспаления, разность между экспрессией bcl-2 и p53 в эндотелии сосудов составляла 7,9 %, а при обострении

Т а б л и ц а 1. **Показатели роста высокозлокачественных нейроэпителиальных опухолей, прихроническомвоспалении**

T a b l e 1. **Growth of high malignant neuroepithelial tumors at chronic inflammation**

Опухоль	bcl-2 (сосуд), %	p53 (сосуд) %	bcl-2 (опухоль), %	p53 (опухоль), %
Глиобластома	26,7 (19,4; 33,6)	18,7 (12,3; 24,5)	14,7 (12,9; 16,5)	13,2 (9,9; 16,5)
Анапластическая астроцитома	21,7 (14,3; 27,5)	13,8 (10,1; 16,5)	13,5 (9,4; 16,7)	12,8 (8,1; 14,9)
Анапластическая олигодендроглиома	20,6 (15,9; 25,6)	13,6 (6,4; 18,3)	13,7 (7,9; 19,5)	12,6 (8,2; 16,5)
Анапластическая олигоастроцитома	19,6 (12,6; 28,2)	12,2 (8,1; 16,9)	13,6 (7,6; 19,3)	12,8 (7,8; 16,5)
Анапластическая эпендимома	21,1 (18,6; 23,2)	13,5 (7,2; 19,1)	13,7 (7,7; 1941)	12,8 (6,2; 18,1)

Т а б л и ц а 2. **Показатели роста высокозлокачественных нейроэпителиальных опухолей приобострениихроническоговоспаления**

T a b l e 2. **Growth of high malignant neuroepithelial tumors during exacerbation of chronic inflammation**

Опухоль	bcl-2 (сосуд), %	p53 (сосуд), %	bcl-2 (опухоль), %	p53 (опухоль), %
Глиобластома	29,1 (28,4; 32,6)	20,3 (16,8; 25,1)	14,8 (11,4; 17,5)	13,3 (11,2; 14,7)
Анапластическая астроцитома	23,6 (17,1; 23,7)	15,4 (13,2; 17,7)	13,6 (11,7; 14,1)	12,8 (10,6; 14,1)
Анапластическая олигодендроглиома	22,9 (16,8; 26,3)	15,8 (13,4; 18,1)	13,6 (11,5; 13,9)	12,8 (11,1; 14,2)
Анапластическая олигоастроцитома	22,7 (16,1; 27,2)	14,7 (11,2; 17,1)	13,5 (12,1; 14,5)	12,7 (9,6; 15,5)
Анапластическая эпендимома	23,2 (16,8; 23,4)	15,2 (12,9; 1,6,2)	13,5 (11,2; 14,7)	12,8 (10,6; 14,1)

хронического воспалительного процесса – 8,7 % ($p < 0,01$), для анапластической астроцитомы – 7,9 и 8,2 % соответственно ($p < 0,05$), для анапластической олигодендроглиомы – 6,9 и 7,1 % ($p < 0,05$), для анапластической олигоастроцитомы – 7,4 и 8,1 % ($p < 0,05$), для анапластической эпендимомы – 7,2 и 7,8 % ($p < 0,05$).

Разность экспрессии bcl-2 и p53 в опухолевых клетках при хроническом воспалении и при его обострении для глиобластомы составила 1,4 и 1,5 %, для анапластической астроцитомы – 0,73 и 0,8, для анапластической олигодендроглиомы – 0,7 и 0,8, для анапластической олигоастроцитомы – 0,7 и 0,8, для анапластической эпендимомы – 0,6 и 0,7 %. При сравнении каждой из групп высокозлокачественных нейроэпителиальных опухолей с контрольной группой количество экспрессии bcl-2 в эндотелиальных клетках было повышено в 3 раза ($p < 0,01$ для каждой из групп).

Экспрессия антиапоптозного фактора bcl-2 увеличивалась поочередно в опухолевых и в эндотелиальных клетках в зависимости от фазы роста опухоли, который начинался с увеличения количества сосудов, однако процентное содержание антиапоптозного фактора в сосудах изменялось более значительно, что проявлялось достоверным увеличением сосудов в «горячей точке» ($p < 0,01$).

Согласно проведенному корреляционному анализу, между экспрессией антигена к ВПГ и EGFR в высокозлокачественных нейроэпителиальных опухолях имеется положительная корреляционная взаимосвязь (для глиобластомы R = 0,900632).

Для низкозлокачественных нейроэпителиальных опухолей характерно наращивание опухолевой массы за счет увеличения клеточной популяции. При сравнении клеточной плотности астроцитом, анапластических астроцитом и глиобластом обнаружено, что она увеличивалась в 2 раза по мере увеличения степени злокачественности, проявляющейся появлением пролиферирующих сосудов. Клеточная плотность астроцитом составляла 98,3, анапластических астроцитом – 186,4, глиобластом – 266,2.

При изучении историй болезни пациентов с глиомами установлено, что в случаях, когда опухоль протекала на фоне обострения хронического воспаления, рецидив отмечался в 2 раза чаще. У пациентов с глиобластомами он выявлялся в период от 3 до 6 мес., в то время как на фоне хронизации процесса эти опухоли рецидивировали в течение 9–12 мес. У пациентов с анапластическими астроцитомами и анапластическими олигодендроглиомами этот период составлял 6–9 и 12–18 мес. соответственно. В случаях с глиомами низкой степени злокачественности (IIGr) на фоне обострения хронического воспаления в первые 12–24 мес. рецидив наблюдался в 30 % опухолей, при этом степень их злокачественности повышалась. Эти же опухоли, протекающие на фоне хронического воспаления, не проявляли себя до 5 лет.

Таким образом, для определения тактики лечения пациента и прогнозирования продолженного роста нейроэпителиальных опухолей при помощи моноклональных антител к CD34 определялось количество сосудов в одном (наиболее васкуляризированном) поле зрения. Это являлось прогностическим признаком для скорости рецидивирования, так как увеличение количества вновь образованных сосудов в опухоли являлось неблагоприятным фактором и указывало

на скорое возникновение рецидива (продолженного роста) в случае нейроэпителиальных опухолей. Для анапластической астроцитомы оно составило 25 и более, для анапластической олигодендроглиомы – 26 и более, для глиобластомы – 37 и более.

При таком количестве сосудов в опухолевой ткани (в одном поле зрения при 40-кратном увеличении) рецидив у анапластической астроцитомы и анапластической олигодендроглиомы возникал через 6–9 мес., у глиобластомы – через 3–6 мес.

Результаты проведенного исследования подтвердили способность неопластических клеток стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, что проявлялось прекращением секреции факторов, ингибирующих ангиогенез. Это подтверждалось усилением экспрессии p53 в опухолевой ткани в ответ на снижение экспрессии его в сосудах. В то же время характер экспрессии bcl-2 был противоположным.

Нейроэпителиальные опухоли II степени злокачественности имели свои особенности роста, обусловленные количеством экспрессии антигена ВПГ в опухолевой ткани. Экспрессия антигена ВПГ была диффузной и очаговой. Эти опухоли экспрессировали антитела к ВПГ одновременно и эндотелием сосудов, и опухолевыми клетками. Количество опухолей, не экспрессирующих антиген ВПГ, у нейроэпителиальных опухолей всех групп было одинаковым. Низкозлокачественные нейроэпителиальные опухоли характеризовались ростом опухолевой массы за счет увеличения клеточной популяции. При увеличении числа клеток в 2 раза появлялся пролиферирующий сосуд, что увеличивало степень агрессивности роста опухоли.

Выводы

1. Основной механизм роста высокозлокачественных нейроэпителиальных опухолей заключается в преимущественной пролиферации эндотелиальных клеток, что определяет первичность роста сосудов, являясь основным механизмом при опухолевой прогрессии.

2. Основной механизм роста низкозлокачественных нейроэпителиальных опухолей характеризуется ростом опухолевой массы за счет увеличения клеточной популяции. При увеличении численности клеток в 2 раза образуется пролиферирующий сосуд, что увеличивает степень агрессивности опухолевого процесса.

3. Нейроэпителиальные опухоли контаминированы ВПГ на 92–93 %. В этиопатогенезе данного процесса лежит продуктивное воспаление, характеризующееся Т-лимфоцитарной инфильтрацией, являющейся ключевым звеном клеточной пролиферации.

4. Пациенты с нейроэпителиальными опухолями, протекающими на фоне воспалительного процесса, вызванного ВПГ, имеют различную степень агрессивности течения заболевания в зависимости от наличия признаков обострения продуктивного воспаления.

5. Механизм взаимодействия вирусного генома с опухолевой тканью заключается в том, что контаминация высокозлокачественных нейроэпителиальных опухолей ВПГ увеличивает количество антиапоптозного фактора (bcl-2) эндотелиальной клетки в среднем в 3 раза. Контаминация низкозлокачественных нейроэпителиальных опухолей ВПГ увеличивает количество антиапоптозного фактора опухолевой клетки (bcl-2) в среднем в 2 раза. Количество эпидермального фактора роста увеличивается в среднем в 2,5 раза во время репликации вируса, проявляющегося у опухолей всех групп в виде клиникоморфологических признаков обострения хронического воспаления.

6. Увеличение количества вновь образованных сосудов в нейроэпителиальной опухоли является неблагоприятным фактором и указывает на более ранее возникновение рецидива (продолженного роста) в случае нейроэпителиальных опухолей. Для анапластической астроцитомы оно составляет 25 и более, для анапластической олигодендроглиомы – 26 и более, для глиобластомы – 37 и более в поле зрения при 400-кратном увеличении.

Список использованных источников

1. Колобов, А. В. Апоптозные и антиапоптозные маркеры в плацентах при инфекции, вызванной вирусами семейства герпеса / А. В. Колобов // Материалы IV Всерос. съезда патологоанатомов МГМИ. – М., 2006. – С. 221.

2. Копнин, Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б. П. Копнин // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 5–33.

3. Хмара, М. Е. Морфологические аспекты персистенции вируса простого герпеса (ВПГ) в головном мозге при хронических энцефалитах и нейроэктодермальных опухолях / М. Е. Хмара, Г. П. Дубойская, М. К. Недзьведь // Патоморфология опухолей и инфекционных заболеваний человека: материалы 4-го Респ. науч. конф. патологоанатомов Беларуси, Минск, 7–8 дек. 2000 г. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, Минск. гос. мед. ин-т, Респ. науч. о-во патологоанатомов; редкол. М. К. Недзьведь [и др.]. – Минск: МГМИ, 2000. – С. 91.

4. Drachmann, D. A. Herpes simplex and acute inclusion body encephalitis / D. A. Drachmann, R. D. Adams // Archs. Neurol. – 1982. – Vol. 7. – P. 61–79.

5. Henchen, F. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis / F. Henchen, D. Hanahan, J. Folknian // Cell. – 1996. – Vol. 86, N 12. – P. 353–368.

References

1. Kolobov A. V. “Apoptotic and anti-apoptotic markers in placenta under infection caused by the viruses of a herpes family”, *Materialy II s’ezda Rossiiskogo obshchestva patologoanatomov* [Materials II Congress of the Russian Society of Pathologists], Moscow, RU, 2006, p. 221.

2. Kopnin B. P. “Action targets of oncogenes and tumor suppressors: a key to the understanding of the basic mechanisms of cancer genesis”, *Biokhimiya* [Biochemistry], 2000, vol. 65, no. 1, pp. 5–33.

3. Khmara M. E., Duboiskaya G. P., Nedz’ved’ M. K. “Morphological aspects of the persistence of the virus of simple herpes (VSH) in the brain at chronic encephalitis and neuroectodermal tumors”, *Patomorfologiya opukholei i infektsionnykh zabolevanii cheloveka: materialy 4 Respublikanskoi nauchnoi konferentsii patologoanatomov Belarusi, Minsk, 7–8 dekabrya 2000 g.* [Pathomorphology of tumors and infectious diseases of humans: Materials of 4 Republican scientific conference of pathologists, Minsk, 7–8 December 2000], Minsk State Medical Institute, Minsk, BY, 2000, p. 91.

4. Drachmann D. A., Adams R. D. “Herpes simplex, acute inclusion body encephalitis”, *Archives of Neurology*, 1982, vol. 7, pp. 61–79.

5. Hanahan D., Folknian J. “Patterns, emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis”, *Cell*, 1996, vol. 86, no. 12, pp. 353–364.

Информация об авторах

Жукова Татьяна Владимировна – канд. мед. наук, врач-патологоанатом. Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии (ул. Кижеватова 60, к. 4, 220024, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Down-house@tut.by

Смеянович Арнольд Федорович – академик, д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ningh@mail.ru

Безубик Сергей Дмитриевич – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ningh@mail.ru

Кузнецов Ярослав Олегович – канд. мед. наук, главный врач. 5-я городская поликлинника (ул. С. Есенина, 21, 220025, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: info@5gp.by

Information about the authors

Zhukova Tatsiana Vladimirovna – Ph. D. (Med.), pathologist. Republic Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics (60-4, Kizhevatova Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Down-house@tut.by

Smeynovich Arnold Phedorovich – Academician, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Republic Scientific and Practical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ningh@mail.ru

Bezubik Cergey Dmitrievich – Ph. D. (Med.), Associate professor, Head of the Department. Republic Scientific and Practical Center of Neurology and Neurosurgery (F. Skorina Str., 24, 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ningh@mail.ru

Kyznetsov Jaroslav Olegovich – Ph. D. (Med.), Head of the 5th City Polyclinic (21, S. Esenina Str., 220025, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: info@5gp.by

Дляцитирования

Механизмы роста трансформированных нейроэпителиальных опухолей / Т. В. Жукова [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 97–102.

Forcitation

Zhukova T., Smeyanovich A., Bezubik S., Kyznetsov O. “Mechanisms of growth of transformed neuroepithelial tumor”. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 97–102.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 612.821.2

Поступила в редакцию 28.10.2016
Received 28.10.2016

Г. П. Миронова, С. Г. Пашкевич

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ АППЛИКАЦИИ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕССЫ ЗАПОМИНАНИЯ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

В экспериментах на 22 половозрелых крысах-самцах, у которых в челночной камере предварительно выработан условный рефлекс избегания, установлено, что после однократной аппликации гамма-аминомасляной кислоты (3 мг/мл в объеме 20 мкл) на слизистую оболочку полости носа крыс процесс угасания условного рефлекса замедляется на 2–3 недели по сравнению с контролем. Интраназальная аппликация гамма-аминомасляной кислоты, предшествующая 5-минутной гипобарической гипоксии, способствует восстановлению естественного угасания условного рефлекса, характерного для контрольных животных.

Таким образом, воздействие на вомероназальный орган крыс классического тормозного медиатора вызывает перестройку интегративной деятельности мозга и способствует улучшению механизмов обучения и памяти, которые при снижении напряжения кислорода в тканях мозга весьма уязвимы.

Ключевые слова: условный рефлекс, интраназальная аппликация, гамма-аминомасляная кислота, гипобарическая гипоксия.

G. P. Mironova, S. G. Pashkevich

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

IMPACT OF THE INTRANASAL APPLICATION OF GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID ON THE MEMORY PROCESSES OF RATS UNDER HYPOXIA CONDITIONS

In the experiments on 22 adult male rats with a conditioned reflex of avoidance prepared in the shuttle chamber, it was found that a single application of gamma-amino butyric acid (3 mg/ml in a volume of 20 μl) at the nasal mucosa of rats was accompanied by deceleration of the extinction process of the conditioned reflex to 2–3 weeks compared with controls. The intranasal application of gamma-amino butyric acid before hypobaric hypoxia (5 min) contributed to the restoration of the natural pattern of extinction of the conditioned reflex, which was typical for the control animals.

Thus, the impact of classical inhibitory neurotransmitter on the vomeronasal organ in rats was characterized by the restructuring of the integrative activity of the brain and the improvement of learning and memory mechanisms that were vulnerable to reduced oxygen tension in the brain tissues.

Keywords: conditioned reflex, intranasal application, gamma-amino butyric acid, hypobaric hypoxia.

Введение. Выработка условного рефлекса сопровождается формированием адаптивного поведения и является физиологическим феноменом преобразования неопределенной информации в определенную и направлена на уменьшение неопределенности в среде. Изучение процессов запоминания включает определение генотипических или врожденных особенностей, опосредующих реализацию безусловных рефлексов, и фенотипических, обеспечивающих обработку и хранение новой информации. Таким образом, в условиях стохастической внешней среды (вероятность единовременного действия во времени и в пространстве двух разных стимулов, как правило, меньше единицы) вероятность подкрепления условного стимула безусловным практически не достигает единицы, а сама последовательность подкрепляемых условных стимулов носит случайный характер.

Интегративная деятельность нейронных популяций коры больших полушарий обеспечивает системные процессы формирования целенаправленного поведения. У грызунов функциональный статус вомероназального комплекса обусловливает характер защитных реакций на ноцицептивные стимулы и процессы принятия решения [1]. Продемонстрировано замедление естественного угасания рефлекса после однократной аппликации на слизистую оболочку полости носа крыс липополисахарида кишечной палочки [2] или ингибиторов сериновых протеаз [3].

© Миронова Г. П., Пашкевич С. Г., 2017

Моделирование однократной 5-минутной гипобарической гипоксии также сопровождалось некоторым улучшением процессов запоминания, что выражалось в увеличении времени сохранности выработанного условного рефлекса избегания у крыс [4].

Защитной реакцией при снижении напряжения кислорода в тканях является повышение уровня гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), при этом гипоксия может вызывать селективную гибель ГАМКергических нейронов [5, 6], а лиганды ГАМК-рецепторов применяют и исследуют в качестве протекторных субстанций [7]. Однако до настоящего времени механизм действия, например, таких препаратов, как аминалон и гаммалон, не вполне понятен, поскольку ГАМК обладает высокой полярностью и при экзогенном введении сложно проникает через гематоэнцефалический барьер. ГАМК участвует в регуляции баланса возбуждающей и тормозной активности центральной нервной системы преимущественно в качестве тормозного нейромедиатора. Повышение концентрации метаболита эндогенной ГАМК отмечено в условиях экстремальных воздействий (гипоксия, ишемия, травма, лучевое поражение) [8]. Экзогенно гамма-оксимасляную кислоту применяют в медицине в качестве средства для общей анестезии, для лечения бессонницы, депрессии, алкоголизма, а также в спорте высших достижений. Эффективным способом коррекции нарушений когнитивных функций при гипоксемии, ишемизации тканей, нейровоспалительных процессах, старении, травмах является активация иммунной системы с применением лигандов ГАМК [9]. Так, при экспериментальном моделировании болезни Паркинсона получены данные о модулирующем влиянии баклофена – агониста $ГАМК_А$- и $ГАМК_В$-рецепторов на поведенческие реакции крыс [10], при этом отмечено улучшение двигательной функции и ослабление окислительных повреждений и нейровоспаления у животных [11]. Обоснована гипотеза, что болезнь Альцгеймера сопровождается первичными хроническими нейровоспалениями, ухудшением процессов формирования памяти, когнитивными нарушениями вследствие развития τ-протеиновой или β-амилоидной патологии [12]. Повышенный уровень провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли α также считают маркером этого заболевания [13]. В экспериментах опосредованное системным введением липополисахарида (ЛПС) кишечной палочки снижение повышенных в крови уровней фактора некроза опухоли α и интерлейкина-6 было достигнуто при применении бикукулина (селективный антагонист $ГАМК_А$-рецептора) или саклофена (селективный антагонист $ГАМК_В$-рецептора) [14]. Подкожные инъекции бетаина повышают экспрессию микроРНК ГАМКтранспортера-2, предотвращают вызванное системным введением ЛПС ухудшение памяти, что подтверждено в тесте Y-лабиринт у мышей [15].

Установлено, что лиганды ГАМК-рецепторов улучшают когнитивные функции. Так, антагонисты $ГАМК_С$-рецептора ингибируют апоптоз, индуцированный аммиаком, сохраняя жизнеспособность нейронов гиппокампа [11]. Известно, что ГАМКергические септогиппокампальные пути вовлекаются в процессы наградного оперантного научения [16]. Актуальным также является исследование возможных путей влияния на нейромедиаторные системы в экстремальных условиях с целью улучшения процессов запоминания. Одним из экстремальных воздействий, в частности, является недостаток кислорода.

Цель работы – оценить влияние интраназальной аппликации гамма-аминомасляной кислоты на реализацию условного рефлекса пассивного избегания крыс в условиях гипобарической гипоксии и определить роль баланса тормозных медиаторов для обоснования подходов неинвазивной коррекции процессов запоминания.

Материалы и методы исследования. Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах (n = 22) массой 185 ± 15 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария (температура воздуха 23 ± 1 °С, вентиляционный режим 30 мин/ч) при свободном доступе к воде и пище, 12/12-часовом режиме освещения и темноты. Все манипуляции с животными выполнены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными [17]. Для изучения процессов запоминания в качестве модели обучения с отрицательным подкреплением использовали тест выработки условных рефлексов в челночной камере по методике Я. Буреша [18].

На начальном этапе исследований в течение 4–5 сут животных адаптировали к экспериментальным условиям (нивелирование проявлений ориентировочного рефлекса). Затем в течение

5–6 сут у крыс вырабатывали условный рефлекс избегания в челночной камере, состоящей из двух разных по площади отсеков – большого (41×47×30 см) и малого (15×25×30 см). В каждом отсеке камеры предусматривалось селективное включение света. Между камерами имелось имитирующее вход «в норку» отверстие, которое при необходимости могло перекрываться дверцей. За один сеанс обучения использовали 8–10 сочетаний условного раздражителя (включение света и открывание дверцы), который подкрепляли безусловным ноцицептивным стимулом (пропускание тока силой 0,008–0,01 мА в течение 1–2 с по решетчатому металлическому полу в отсеках большой или малой камеры, где находилась крыса). Животных, у которых после 5–6 сут выработки условного рефлекса отмечалось 80 % и более воспроизведений реакции избегания на условный раздражитель (включение света и открывание дверцы – критерии выработки условного рефлекса, так как не было подкрепления электрическим стимулом), отбирали для дальнейших исследований. Крыс, у которых условный рефлекс долгое время не вырабатывался, исключали из эксперимента.

После выработки условного рефлекса (за период 5–6 сут 80 % и более воспроизведений) регистрировали латентный период реакции избегания (ЛПРИ) в течение 2–3 сут (фон). Затем животных разделили на 4 группы. Регистрацию воспроизведения выработанного условного рефлекса через 1,5 ч после воздействия нового стимула проводили с целью анализа особенностей формирования долговременной памяти.

В соответствии с протоколом опытов в день основного эксперимента контрольную группу сформировали из интактных крыс (n = 6) для анализа процесса воспроизведения и угасания условного рефлекса избегания.

Первая экспериментальная группа включала особей (n = 6), которых подвергали 5-минутной гипобарической гипоксии и через 15–20 мин и 1,5 ч регистрировали ЛПРИ в челночной камере.

Крысам второй группы (n = 5) однократно наносили на слизистую оболочку полости носа 20 мкл (по 10 мкл в каждый носовой ход) раствора ГАМК (3 мг/мл, Sigma-Aldrich, США). Малая доза (3 мг/мл) вводимого крысам раствора (20 мкл) ГАМК выбрана потому, что при интраназальном способе введения максимальный эффект достигается при использовании концентрации вещества, в 5–10 раз меньшей, чем при внутрибрюшинном его применении [19]. Через 15 мин после окончания инстилляции ГАМК крыс подвергали 5-минутной гипобарической гипоксии, сразу после окончания сеанса и через 1,5 ч регистрировали ЛПРИ.

Крысам третьей опытной группы (n = 5) однократно апплицировали на слизистую оболочку полости носа по 20 мкл раствора ГАМК (3 мг/мл). В этот же день через 15–20 мин и через 1,5 ч после аппликации раствора животных помещали в челночную камеру и регистрировали ЛПРИ.

При моделировании кратковременной гипоксии руководствовались методическими рекомендациями [20, 21]. Гипобарическую (экзогенную) гипоксию моделировали в течение 5 мин в специальной емкости объемом 2 л, оснащенной декомпрессором и манометром, достигая условной высоты в 2300 м над уровнем моря. Давление в системе измеряли вакуумметром (Россия). С помощью декомпрессора постепенно (в течение 2 мин) создавали разряжение, снижая барометрическое давление в системе до 577,6 мм рт. ст., что сопровождалось небольшой девиацией парциального давления кислорода до 121 мм рт. ст. Постепенное снижение барометрического давления является пусковым механизмом включения реакций, направленных на компенсацию дефицита кислорода. Отсчет времени воздействия вели с момента достижения заданного значения барометрического давления, регистрируемого с помощью вакуумметра. При подъеме на такую высоту насыщение кислородом крови ослабляется незначительно (на 4–5 мм рт. ст.). С помощью поглотителя CO_2. (96 % $Ca(OH)_2$ и 4 % NaOH) избегали развития гиперкапнии в системе.

Динамику изменений ЛПРИ у всех крыс прослеживали на 3, 7, 14, 21, 28, 35 и 42-е сутки. Статистическую значимость полученных результатов оценивали при помощи критерия Манна–Уитни для непараметрических выборок и представляли в виде M ± m. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Фоновые значения ЛПРИ у крыс всех групп не имели статистически достоверных отличий. Величина ЛПРИ составляла в среднем 2,2 ± 0,05 с при переходе из большой камеры в малую и 4,6 ± 0,04 с при переходе из малой камеры в большую.

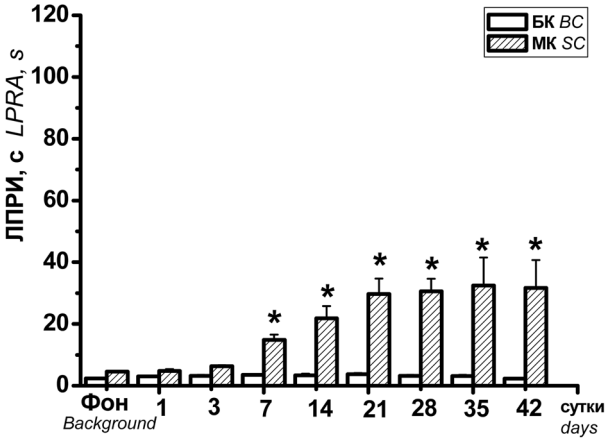


Рис. 1. Динамика величины ЛПРИ (с) у крыс (n = 6) контрольной группы в течение 42 сут после выработки условного рефлекса избегания. Фон – среднее значение ЛПРИ за 2–3 сут. Белые столбики – ЛПРИ при переходе крыс из большой камеры в малую (БК), заштрихованные столбики – ЛПРИ при переходе крыс из малой камеры в большую (МК).* – $p < 0{,}05$ по отношению к фону

Fig. 1. LPRA dynamics (s) of rats (n = 6) of the control group during 42 days after the development of conditioned reflex avoidance. Background – the average value for 2–3 LPRA days. White columns – LPRA when rats are moving from a big to a small chamber (BC), the shaded bars –LPRA when rats are moving from a small to a big chamber (SC).* – $p < 0.05$ relative to the background

Как представлено на рис. 1, рефлекс перехода крыс из большой камеры в малую оставался на уровне фоновых значений на протяжении всего периоды наблюдения, а ЛП реакции перехода из малой камеры в большую прогрессивно увеличивался, что полностью соответствует динамике угасания условного рефлекса у интактных крыс. Такая же картина развития процесса угасания наблюдалась и в экспериментах, проведенных ранее [2].

Увеличение ЛПРИ при переходе из малой камеры в большую у крыс первой опытной группы наблюдалось через 15–20 мин ($p < 0{,}05$) и через 1,5 ч ($p < 0{,}05$) после применения 5-минутной гипоксии. При этом латентный период (ЛП) реакции перехода из большой камеры в малую также в 1,5 раза возрос по сравнению с фоном (рис. 2, *I*).

Об ухудшении процессов воспроизведения информации через 1,5 ч свидетельствовало увеличение ЛП реакции перехода из малой камеры в большую в 7,6 раза по сравнению с фоном (рис. 2, *II*). К 3-м и 7-м суткам после моделирования гипоксии ЛПРИ при переходе из большой камеры в малую у крыс контрольной и первой опытной группы практически не отличался от фона (рис. 1, 2).

На 14-е сутки ЛП реакции перехода из малой камеры в большую у крыс контрольной группы приближался к фоновым значениям, а у крыс первой опытной группы он превышал их. ЛП перехода из большой камеры в малую у крыс обеих групп сохранялся на уровне фона (рис. 1, 2).

С 21-х суток у животных первой опытной группы зафиксировано достоверное ($p < 0{,}05$) увеличение (в 2–2,5 раза по отношению к фону) ЛПРИ при переходе из большой камеры в малую, а на 28, 35 и 42-е сутки наблюдения ЛП реакции перехода из большой камеры в малую оставался практически стабильным.

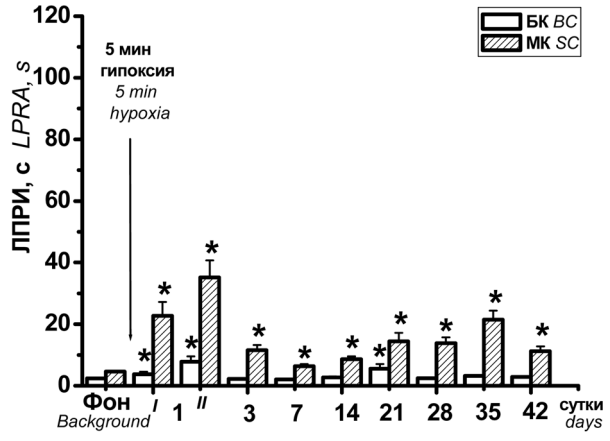


Рис. 2. Динамика величины ЛПРИ (с) у крыс (n = 6) до и после 5-минутной гипоксии. Фон – ЛПРИ до гипоксии. Стрелкой указана 5-минутная гипоксия (*I* – ЛПРИ через 15–20 мин, *II* – ЛПРИ через 1–1,5 ч). Остальные обозначения те же, что на рис. 1

Fig. 2. LPRA dynamics (s) of rats (n = 6) before and in 5 minutes of hypoxia. Background – LPRA before hypoxia. Arrow – 5-minute hypoxia (*I* – LPRA in 15–20 min, *II* – LPRA in 1–1.5 h). Other designations are the same as in Fig. 1

Таким образом, у крыс, подвергавшихся кратковременной гипобарической гипоксии, угасание условного рефлекса происходило примерно в 2 раза медленнее, чем у животных контрольной группы. Следовательно, 5-минутная гипоксия приводит к нарушению процессов забывания и в какой-то мере способствует улучшению процессов запоминания.

У животных второй опытной группы (n = 5) величина ЛПРИ до воздействий составляла при переходе из большой камеры в малую 2,2 ± 0,4 с, а при переходе из малой камеры в большую – 4,7 ± 0,7 с (рис. 3, *а*).

Через 1,5 ч после интраназальной аппликации ГАМК и последующей 5-минутной гипоксии зарегистрировано резкое угнетение условно-рефлекторной деятельности, что особенно наглядно проявлялось достовер-

ным ($p < 0,05$) увеличением (почти в 20 раз по отношению к фону) ЛП реакции перехода крыс из малой камеры в большую. При применении условных раздражителей (включение света и открывание дверцы) во время эксперимента животные дольше задерживались в малой камере (более 180 с), а иногда и отказывались выходить из нее. ЛПРИ при переходе из большой камеры в малую также увеличился – от 2,2 ± 0,4 до 4,8 ± 0,8 с (рис. 3, *a*).

Наблюдаемый в первые часы после сочетанного воздействия двух экстремальных факторов эффект скорее всего являлся проявлением стресса. Причем выраженность нарушений условно-рефлекторной деятельности через 1–1,5 ч после воздействия ГАМК и 5-минутной гипоксии в 4–5 раз превышала сдвиги ЛПРИ при аппликации раствора ГАМК (рис. 3, *a*, *b*).

Спустя 3 сут после применения указанных факторов в сравнении с первым днем наблюдения отмечалось некоторое снижение величины ЛП реакции перехода крыс из малой камеры в большую, которая, однако, в 11,5 раза превышала фоновый уровень. Следует отметить, что при переходе животных из большой камеры в малую величина ЛПРИ была равна фоновым значениям и сохранялась на этом уровне на 7, 14, 21, 28 и 35-е сутки наблюдения, и только к 42-м суткам отмечалось превышение ее фонового уровня в 2 раза (рис. 3, *a*).

Как представлено на рис. 3, *a*, на 7-е сутки после применения аппликации ГАМК предшествующей 5-минутной гипоксии, ЛП реакции перехода из малой камеры в большую значительно уменьшился по сравнению с таковым на 3-и сутки наблюдения, однако оставался выше фона почти в 4 раза. С 14-х по 42-е сутки наблюдения отмечалось постепенное увеличение величины ЛПРИ при переходе крыс из малой камеры в большую, что является характерным признаком угасания выработанного рефлекса.

Таким образом, предъявление гипоксического стимула или его сочетание с аппликацией ГАМК (3 мг/мл) на слизистую оболочку полости носа крыс через 1,5 ч вызывает угнетение условной реакции избегания, причем более выраженное (в 4–5 раз, $p < 0,05$) при сочетанном предъявлении ГАМК и гипоксии, чем при воздействии одной гипоксии.

Величина ЛПРИ у крыс третьей опытной группы до интраназального введения раствора ГАМК при переходе из большой камеры в малую составляла в среднем 2,2 ± 0,3 с, а при переходе из малой камеры в большую – 4,8 ± 0,6 с (рис. 3, *b*, фон).

Показано, что через 15–20 мин после аппликации раствора ГАМК у крыс наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение ЛПРИ (от 2,2 ± 0,3 до 4,1 ± 0,8 с) при переходе из большой камеры в малую. Латентный период реакции перехода из малой камеры в большую не изменялся

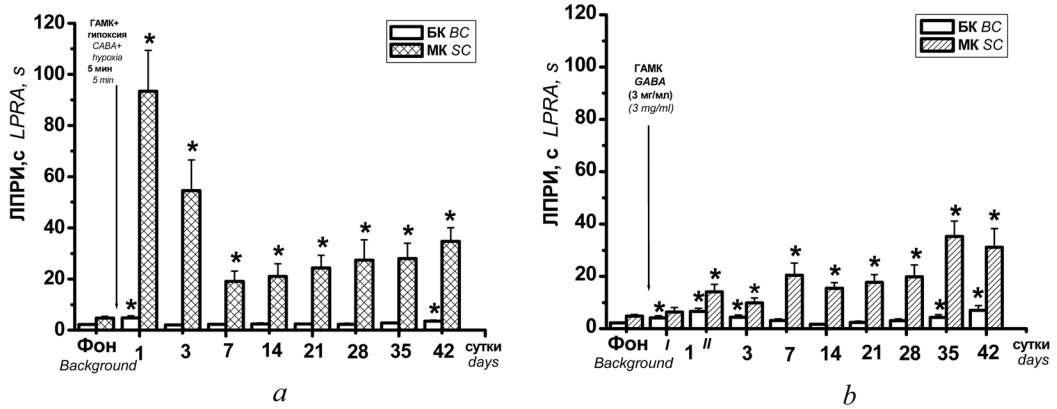


Рис. 3. Динамика величины ЛПРИ (с): *a* – после однократной интраназальной аппликации раствора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК, 3 мг/мл) и 5-минутной гипоксии ($n = 5$); *b* – после однократной интраназальной аппликации раствора ГАМК (3 мг/мл) ($n = 5$). Фон – ЛПРИ до введения раствора; стрелкой указан момент воздействия 5-минутной гипоксии и/или введения раствора (*I* – ЛПРИ через 15–20 мин, *II* – ЛПРИ через 1–1,5 ч). Остальные обозначения те же, что на рис. 1

Fig. 3. LPRA dynamics (s): *a* – after a single intranasal application of gamma amino butyric acid GABA solution (3 mg/ml) and in 5 minutes of hypoxia ($n = 5$); *b* – after a single intranasal application of the GABA solution (3 mg/ml) ($n = 5$). Background – LPRA prior to the administration of the solution; arrow – the impact in 5 minutes of hypoxia and/or the administration of the solution (*I* – LPRA in 15–20 min, *II* – LPRA in 1–1.5 h). Other designations are the same as in Fig. 1

(рис. 3, *a*, *b*). Спустя 1,5 ч отмечалось 3-кратное (по сравнению с фоном) увеличение ЛП реакции перехода как из большой камеры в малую, так и из малой камеры в большую (рис. 3, *b*, *I*). Необходимо отметить, что величина реакции избегания через 1,5 ч после аппликации ГАМК была в 6–7 раз меньше, чем после сочетанного воздействия ГАМК и 5-минутной гипоксии (рис. 3, *a*, *b*).

На 3-и сутки после аппликации раствора ГАМК величина ЛПРИ у крыс при переходе из большой камеры в малую и из малой камеры в большую превышала фоновый уровень в 2 раза (рис. 3, *b*).

К 7-м суткам ЛПРИ при переходе крыс из малой камеры в большую возрос по отношению к фону в 4,2 раза (рис. 3, *b*). К 14-м и 21-м суткам ЛП реакции перехода из малой камеры в большую продолжал нарастать и к 35-м суткам наблюдения его значение превышало фон в 7,3 раза (рис. 3, *b*). Следует отметить, что у животных к этому времени отмечалась нестабильность воспроизведения рефлекса избегания, когда крыса при предъявлении условного сигнала то задерживалась в малой камере более 160–180 с, то выбегала из нее за 1,5–2 с. Чаще всего эта закономерность проявлялась при переходе животных из малой камеры в большую. Все это свидетельствует о начале развития процесса угасания выработанного условного рефлекса.

К концу периода наблюдения (на 42-е сутки) у крыс после аппликации раствора ГАМК величина ЛПРИ при переходе из малой камеры в большую хотя и оставалась в 6,3 раза выше фона (31,1 ± 7,2 с), не достигала критических значений (180 с), как у интактных животных, т. е. условный рефлекс полностью не угасал. Следовательно, интраназальная аппликация раствора ГАМК (3 мг/мл) крысам с выработанным условным рефлексом избегания вызывает замедление (на 2–3 недели по сравнению с интактными животными) естественного процесса угасания условного рефлекса.

Итак, однократная аппликация 20 мкл ГАМК на слизистую оболочку полости носа крыс приводит в первые трое суток после воздействия к некоторой стабилизации реакции избегания по сравнению с таковой после сочетанного воздействия ГАМК и 5-минутной гипоксии.

Поскольку через 7–10 сут после сочетанного воздействия ГАМК и 5-минутной гипоксии картина угасания условного рефлекса у животных сходна с таковой у крыс контрольной группы, можно предположить, что аппликация ГАМК перед воздействием гипоксии способствует восстановлению картины естественного угасания условного рефлекса, так как при гипоксии процесс угасания у животных замедлялся.

Заключение. Традиционное применение аналогов ГАМК (например, пероральный прием или внутрибрюшинные инъекции) исключает их воздействие на вомероназальный комплекс. В ходе исследования установлено, что после однократной интраназальной аппликации раствора ГАМК у крыс на 2–3 недели замедляется процесс угасания условного рефлекса, а аппликация ГАМК перед применением 5-минутной гипоксии способствует восстановлению естественного процесса угасания условного рефлекса.

Так, производные ГАМК – фенибут и его метиловый аналог (при внутрибрюшинном введении) – в аналогичном тесте статистически значимо улучшают закрепление информации в памяти животных, замедляют угасание памятного следа в динамике, преимущественно через 7, 14 и 30 сут после выработки рефлекса, что свидетельствует о наличии у данных препаратов ноотропной активности [22]. Это предполагает возможность коррекции процессов запоминания при интраназальном применении ГАМК в условиях недостатка кислорода.

Выявленные эффекты целесообразно учитывать при приеме назначенных лекарственных средств, содержащих ГАМК, особенно при наличии воспалительных процессов в полостях носа и воздухоносных путях, что инициирует естественное развитие гипоксических состояний.

Список использованных источников

1. Целкова, И. В. Системные защитные реакции при интраназальной аппликации эндотоксина / И. В. Целкова, В. А. Кульчицкий // LAP LAMBERT: Academic Publishing, 2015. – 138 с.

2. Миронова, Г. П. Особенности угасания условного рефлекса у крыс после интраназальной аппликации эндотоксина / Г. П. Миронова, И. В. Стрижак // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2011. – № 1. – С. 52–55.

3. Миронова, Г. П. Влияние ингибиторов сериновых протеиназ на формирование условных рефлексов у экспериментальных животных / Г. П. Миронова, В. П. Голубович // Новости мед.-биол. наук. – 2008. – № 1–2. – С. 99–103.

4. Миронова, Г. П. Влияние снижения напряжения кислорода на когнитивные функции в эксперименте / Г. П. Миронова, Л. С. Ханило, С. Г. Пашкевич // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2015. – Т. 59, № 3. – С. 78–82.

5. Самойлов, М. О. Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы формирования протективных эффектов гипоксического прекондиционирования / М. О. Самойлов, Е. А. Рыбникова, А. В. Чурилова // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2012. – № 3. – С. 3–10.

6. Кратковременная гипоксия вызывает селективную гибель ГАМК-ергических нейронов / М. В. Туровская [и др.] // Биол. мембраны. – 2013. – Т. 30, № 5–6. – С. 479–490.

7. ГАМКергическая система в реализации анксиолитического действия «Пропротена»: эксперим. исследование / Т. А. Воронина [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2003. – № 1. – С. 37–39.

8. Розанов, В. А. Роль системы ГАМК в механизмах фармако-метаболической защиты мозга от гипоксии / В. А. Розанов // Анестезиология и реаниматология. – 1989. – № 2. – С. 68–78.

9. Systemic lipopolysaccharide administration impairs retrieval of context-object discrimination, but not spatial, memory: Evidence for selective disruption of specific hippocampus-dependent memory functions during acute neuroinflammation / J. Czerniawski [et al.] // Brain Behav. Immun. – 2015. – Vol. 44. – P. 159–166.

10. Tyagi, R. K. Possible role of GABA-B receptor modulation in MPTP induced Parkinson's disease in rats / R. K. Tyagi, R. Bisht, J. Pant // Exp. Toxicol. Pathol. – 2015. – Vol. 67, N 2. – P. 211–217.

11. Chebib, M. GABA-Activated Ligand Gated Ion Channels: Medicinal Chemistry and Molecular Biology / M. Chebib, G. A. R. Johnston // J. Med. Chem. – 2000. – Vol. 43, N 8. – P. 1427–1447.

12. Nazem, A. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease / A. Nazem, R. Sankowski, M. Bacher // J. Neuroinflammation. – 2015. – Vol. 17, N 12. – P. 74.

13. Tweedie, D. Tumor necrosis factor-α synthesis inhibitor 3,6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease / D. Tweedie, R. A. Ferguson, K. Fishman // J. Neuroinflammation. – 2012. – Vol. 29, N 9. – P. 106.

14. Sallam, M. Y. Central GABAA receptors are involved in inflammatory and cardiovascular consequences of endotoxemia in conscious rats / M. Y. Sallam // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – 2016. – Vol. 389, N 3. – P. 279–288.

15. Miwa, M. Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter 2 / M. Miwa, M. Tsuboi, Y. Noguchi // J. Neuroinflammation. – 2011. – Vol. 4, N 8. – P. 153.

16. Vega-Flores, G. The GABAergic Septohippocampal Pathway Is Directly Involved in Internal Processes Related to Operant Reward Learning / G. Vega-Flores, S. E. Rubio, M. T. Jurado-Parras // Cereb Cortex. – 2014. – Vol. 24, N 8. – P. 2093–2107.

17. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Europ. Treaty Series. – 1986. – N 123. – 48 p.

18. Буреш, Я. Методика и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М., 1991. – 400 с.

19. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

20. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / под ред. Л. Д. Лукьяновой. – М., 1990. – 18 с.

21. Литвицкий, П. Ф. Патофизиология: учебник / П. Ф. Литвицкий. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2015. – Т. 1–2. – 792 с.

22. Сравнительное экспериментальное изучение ноотропных свойств аналога ГАМК фенибута и его метилового эфира / В. В. Багметова [и др.] // Фунд. исслед. – 2011. – № 10. – С. 467–471.

References

1. Tselkova I. V., Kulchitskii V. A. *Sistemnye zashchitnye reaktsii pri intranazal'noi applikatsii endotoksina* [Systemic protective responses at intranasal application of endotoxin], LAP LAMBERT: Academic Publishing, 2015.

2. Mironova G. P., Strizhak I. V. "Features of conditional reflex fading of rats after the intranasal application of endotoxin", *Vestsi Natsyyanalnai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Series of Medical Sciences], 2011, no. 1, pp. 52–55.

3. Mironova G. P., Golubovich V. P. Influence of serine proteinase inhibitors on the formation of conditional reflexes of experimental animals", *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of Biomedical Sciences], 2008, no. 1–2, pp. 99–103.

4. Mironova G. P., Khanilo L. S., Pashkevich S. G. "Influence of a decrease in oxygen stress on the cognitive functions in the experiment", *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2015, vol. 59, no. 3, pp. 88–92.

5. Samoilov M. O., Rybnikova E. A., Churilova A. V. "Signal molecular and hormonal mechanisms of formation of the protective effects of hypoxic preconditioning", *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya* [Pathological Physiology and Experimental Therapy], 2012, no. 3, pp. 3–10.

6. Turovskaya M. V., Turovskii E. A., Kononov A. V., Zinchenko V. P. "Short hypoxia causes the selective death of GABAergic neurons", *Biologicheskie membrany* [Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology], 2013, vol. 30, no. 5–6, pp. 479–490.

7. Voronina T. A., Molodavkin G. M., Sergeeva S. A., Epshtein O. I. "GABAergic system in the realization of the anxiolytic action of Proproten: an experimental study", *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2003, no. 1, pp. 37–39.

8. Rozanov V. A. "Role of the GABAegric system in the mechanisms of the pharmacological-metabolic protection of the brain from hypoxia", *Anesteziologiya i reanimatologiya* [Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology], 1989, no. 2, pp. 68–78.

9. Czerniawski J., Miyashita T., Lewandowski G., Guzowski J. F. "Systemic lipopolysaccharide administration impairs retrieval of context-object discrimination, but not spatial, memory: Evidence for selective disruption of specific hippocampus-dependent memory functions during acute neuroinflammation", *Brain, Behavior, and Immunity*, 2015, vol. 44, pp. 159–166.

10. Tyagi R. K., Bisht R., Pant J. "Possible role of GABA-B receptor modulation in MPTP induced Parkinsons disease in rats", *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2015, vol. 67, no. 2, pp. 211–217.

11. Chebib M., Johnston G. A. R. "GABA-Activated Ligand Gated Ion Channels: Medicinal Chemistry and Molecular Biology", *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, vol. 43, no. 8, pp. 1427–1447.

12. Nazem A., Sankowski R., Bacher M., Al-abed Yo. "Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease", *Journal of Neuroinflammation*, 2015, vol. 17, no. 12, p. 74.

13. Tweedie D., Ferguson R. A., Fishman K., Frankola K. A., Van Praag H., Holloway H. W., Luo W., Li Ya., Caracciolo L., Russo I., Barlati S., Ray B., Lahiri D. K., Bosetti F., Greig N. H., Rosi S. "Tumor necrosis factor-α synthesis inhibitor 3,6′-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimers disease", *Journal of Neuroinflammation*, 2012, vol. 9, no. 1, p. 106.

14. Sallam M. Y., El-Gowilly S. M., Abdel-Galil A. G., El-Mas M. "Central GABAA receptors are involved in inflammatory and cardiovascular consequences of endotoxemia in conscious rats", *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2016, vol. 389, no. 3, pp. 279–288.

15. Miwa M., Tsuboi M., Noguchi Y., Enokishima A., Nabeshima T., Hiramatsu M. "Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter 2", *Journal of Neuroinflammation*, 2011, vol. 4, no. 8, p. 153.

16. Vega-Flores G., Rubio S. E., Jurado-Parras M. T., Gómez-Climent M. A., Hampe C. S., Manto M., Soriano E., Pascual M., Gruart A., Delgado-García J. M. "The GABAergic Septohippocampal Pathway is Directly Involved in Internal Processes Related to Operant Reward Learning", *Cerebral Cortex*, 2014, vol. 24, no. 8, pp. 2093–2107.

17. *European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*, European Treaty Series, no. 123, Strasbourg, FR, 1986.

18. Buresh Ya., Bureshova O., H'yuston D. *Metodika i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya* [Methods and the main experiments on the brain and its behavior], Moscow, RU, 1991.

19. Khabriev R. U. (ed.). *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv* [Manual on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances], 2nd ed., revised and enlarged, Medicine Ltd., Moscow, RU, 2005.

20. Luk'yanova L. D. (ed.). *Metodicheskie rekomendatsii po eksperimental'nomu izucheniyu preparatov, predlagaemykh dlya klinicheskogo izucheniya v kachestve antigipoksicheskikh sredstv* [Methodical recommendations on the experimental study of preparations proposed for the clinical study as antihypoxial means], Moscow, 1990.

21. Litvitskii P. F. *Patofiziologiya: uchebnik* [Pathophysiology: text-book], 5nd ed., revised and expanded, GEOTAR Media, Moscow, RU, 2015, vol. 1–2.

22. Bagmetova V. V., Borodkina L. E., Tyurenkov I. N., Berestovitskaya V. M., Vasil'eva O. S. "Comparative experimental study of nootropic properties of the analog of GABA phenibutum and its methyl alcohol", *Fundamentalnye issledovaniya* [Fundamental research], 2011, no. 10, pp. 467–471.

Информация об авторах

Миронова Галина Павловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь)

Пашкевич Светлана Георгиевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: skypasht@mail.ru

Для цитирования

Миронова, Г. П. Влияние интраназальной аппликации гамма-аминомасляной кислоты на процессы запоминания у крыс в условиях гипоксии / Г. П. Миронова, С. Г. Пашкевич // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 103–110.

Information about the authors

Mironova Galina Pavlovna – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus)

Pashkevich Svetlana Georgievna – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: skypasht@mail.ru

For citation

Mironova G. P., Pashkevich S. G. "The impact of intranasal application of gamma-aminobutyric acid on processes of memory in rats in hypoxia". *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 103–110.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 576.3:577.352:61

Поступила в редакцию 28.10.2016
Received 28.10.2016

С. Г. Пашкевич, Д. П. Токальчик, Г. П. Миронова, М. О. Досина, О. Г. Тихонович, Ю. П. Стукач, В. Н. Калюнов

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

РЕАЛИЗАЦИЯ ЖИЗНЕННО ВАЖНЫХ ФУНКЦИЙ КРЫС В УСЛОВИЯХ РЕОРГАНИЗАЦИИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ГИППОКАМПА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

В лаборатории нейрофизиологии Института физиологии НАН Беларуси верифицирована гипотеза о том, что один из механизмов нейропластичности при травме мозга проявляется в естественной активации процесса миграции мезенхимальных стволовых клеток (МСК), отработан протокол получения и культивирования МСК, оценена их жизнеспособность, обоснована возможность применения флуоресцирующих маркеров для визуализации процессов их миграции, проанализированы неинвазивные пути доставки МСК к местам повреждения.

В экспериментах на крысах-самцах показано, что введение МСК в подслизистое пространство полостей носа крыс через 10 мин после унилатеральной деструкции путем аспирации 20 мкл ткани СА1 области гиппокампа сопровождается восстановлением жизненно важных функций, а также выработанных ранее рефлексов защитного и ориентировочного характера в целом на одну неделю раньше, чем у крыс, которым после аналогичных деструкций мозга не вводили МСК в подслизистые оболочки полостей носа.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, гиппокамп, защитные рефлексы.

S. G. Pashkevich, D. P. Tokalchik, G. P. Mironova, M. O. Dosina, O. G. Tichonovich, Yu. P. Stukach, V. N. Kalyunov

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

IMPLEMENTATION OF THE VITAL FUNCTIONS OF RATS AFTER THE REORGANIZATION OF THE NEURAL HIPPOCAMPUS CIRCUITRY BY MESENCHYMAL STEM CELLS

At the Laboratory of Neurophysiology of the Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus the hypothesis was verified that one of the mechanisms of neuroplasticity with brain injury manifests itself in the natural activation of the process of migration of mesenchymal stem cells (MSCs). The protocol of obtaining and cultivating MSCs culture was worked out, evaluated their viability was evaluated, the possibility of using fluorescent markers for visualization of the migration processes was substantiated, the non-invasive ways to deliver MSCs to the injury site were analyzed.

In experiments on male rats it was demonstrated that the administration of mesenchymal stem cells in the sub-mucosal space of the nasal cavities of rats in 10 minutes after the unilateral destruction by the aspiration of 20 microlitre of the tissue CA1 of the hippocampus region is accompanied by the restoration of the vital functions and the protective and indicative reflexes as a whole by one week earlier than in the rats, into which MSCs were not administered after similar destructions of the brain in the sub-mucosal membrane of the nasal cavities.

Keywords: mesenchymal stem cells, hippocampus, protective reflexes.

Введение. В живом организме задачу интеграции и координации всех процессов для достижения конечного приспособительного результата выполняют популяции нервных клеток и нейронные сети. В основе восстановления или компенсации нарушенных функций при повреждениях головного мозга лежат механизмы нейропластичности, реализация которых зависит от множества факторов – синаптических, внесинаптических, внецеребральных, внеорганизменных. Сравнительно недавно установлено, что нейральные стволовые клетки присутствуют главным образом в субвентрикулярной зоне боковых желудочков и в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа. Процесс нейрогенеза в этих зонах происходит постоянно, обеспечивая гомеостатическую, адаптивную и репаративную регенерацию структур мозга [1, 2]. Интенсивность обновления популяции интернейронов обонятельной луковицы и гиппокампа за счет размножения, миграции и дифференцировки нейральных стволовых клеток герминативных зон высока, но зависит от возраста и функциональной активности и изменяется в условиях патологии [3]. Известно, что гиппокамп имеет широкую конвергенцию сигналов разных сенсорных модально-

стей, обладающих новизной, и принимает участие в процессах подавления ответов на сигналы, уже зафиксированные в прошлом опыте организма [4]. Кроме того, гиппокамп участвует в механизмах формирования эмоций, пространственной ориентации, а также консолидации памяти [5], но восстановление функционирования его нейронных сетей при травме или операционных процедурах посредством активации эндогенных репаративных процессов затруднено [4]. В ходе исследований, проведенных в лаборатории нейрофизиологии [6], верифицирована гипотеза о том, что один из механизмов нейропластичности при травме мозга проявляется в естественной активации процесса миграции мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Предварительно отработан протокол получения и культивирования МСК, оценена их жизнеспособность, обоснована возможность применения флуоресцирующих маркеров для визуализации процессов их миграции [7, 8], проанализированы неинвазивные пути доставки МСК к местам повреждения [8].

Цель исследования – проверка гипотезы о возможности восстановления жизненно важных функций экспериментальных животных после унилатерального извлечения участка CA1 области гиппокампа и интраназального введения в подслизистые полости носа крыс мезенхимальных стволовых клеток.

Материалы и методы исследования. Крыс содержали в стандартных условиях вивария (температура воздуха 23 ± 1 °С, вентиляционный режим 30 мин/ч) при свободном доступе к воде и пище, 12/12-часовом ритме освещения и темноты. Все манипуляции с животными выполнены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными [9, 10]. В условиях уретан-нембуталового наркоза (40 мг/кг нембутала и 500 мг/кг уретана) выполняли трепанацию черепа (n = 8), согласно координатам атласа головного мозга крыс линии Вистар [11] (рис. 1), или извлекали с помощью пипет-дозатора (Transferpette®S, 200 мл) участок CA1 области гиппокампа объемом 20 мкл (n = 8).

Через 10 мин крысам с локальным разрушением участков гиппокампа (n = 8) и интактным животным (n = 8) в подслизистые оболочки полости носа вводили 50 мкл клеточной суспензии (40 тыс. клеток в 50 мкл).

В стерильных условиях операционной, согласно утвержденной Ученым советом Института физиологии НАН Беларуси от 26 августа 2010 г. «Методике выделения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани» (протокол № 8), получали постнатальные аллогенные МСК. Клеточную суспензию готовили в день проведения операции. Для этого монослой мезенхимальных клеток снимали с помощью 1 мл раствора трипсина (Sigma, Германия). Флаконы по-

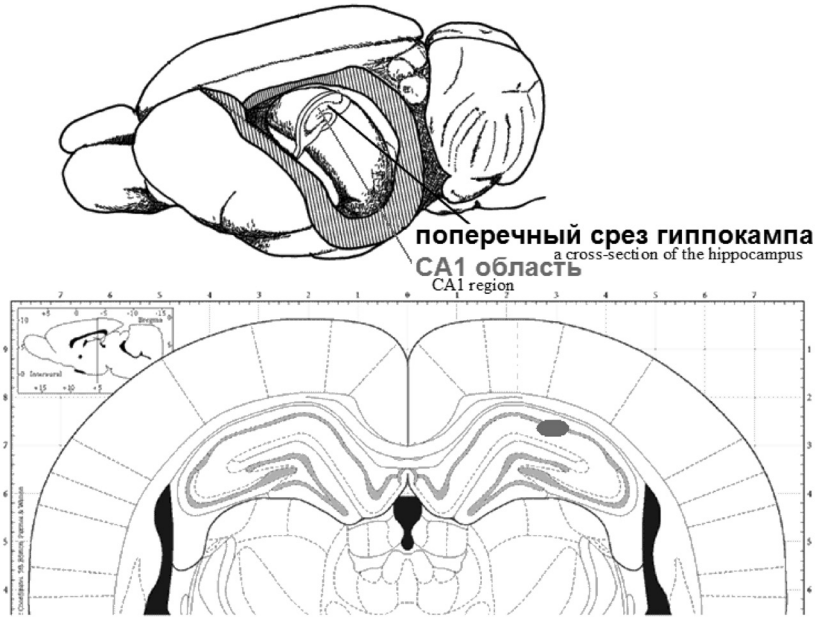


Рис. 1. Схема локализации деструкции в CA1 области гиппокампа

Fig. 1. Diagram of the destruction localization in CA1 of the hippocampus region

мещали на 3 мин в CO_2-инкубатор при температуре 37 °С, после чего клетки центрифугировали в течение 10 мин при скорости 1500 об/мин в 5 мл фосфатного буферного раствора (ФБР) с содержанием 10 % фетальной телячьей сыворотки (ФТС, Sigma, Германия). Удаляли супернатант, осадок ресуспензировали в 5 мл ФБР и центрифугировали 10 мин при скорости 1500 об/мин. После удаления образовавшегося супернатанта клетки окрашивали флуоресцентным красителем PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma, Германия) по методике, рекомендованной производителем. Окрашенные клетки разводили в 0,5 мл ФБР с содержанием 10 % ФТС.

Поперечные срезы мозга для микроскопического исследования получали на криостате через 10 сут после интраназального введения клеток. Образцы толщиной 8 мкм размещали на предметном стекле и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа (OPTON ISM 405, West Germany, цифровая камера Leica DC 300F) при 16-кратном увеличении (длина волны возбуждения 490 нм, длина волны испускания 502 нм).

Результаты иммуногистохимического анализа оценивали как количественно, так и качественно. Качественная оценка основана на интенсивности окрашивания цитоплазмы: 0 – окрашивание отсутствует, 1 – слабое окрашивание, 2 – окрашивание средней интенсивности, 3 – сильное окрашивание. Количественно оценивали процентное содержание окрашенных клеток (от 0 до 100 %). Экспрессию CD90 рассчитывали по формуле Hscore (histochemical score – гистохимический индекс): $1a + 2b + 3c$, где a – доля клеток со слабым окрашиванием, %; b – доля клеток с умеренно выраженным окрашиванием, %; c – доля клеток с сильно выраженным окрашиванием, %.

Для проведения исследования было сформировано 5 групп: 1) контроль – интактные ($n = 8$); 2) имплантация МСК в подслизистые оболочки полости носа ($n = 8$); 3) унилатеральная трепанация черепа в проекционной зоне травмы гиппокампа ($n = 8$); 4) унилатеральная деструкция гиппокампа ($n = 8$); 5) имплантация МСК в подслизистые оболочки полости носа через 10 мин после унилатерального извлечения гиппокампа ($n = 8$).

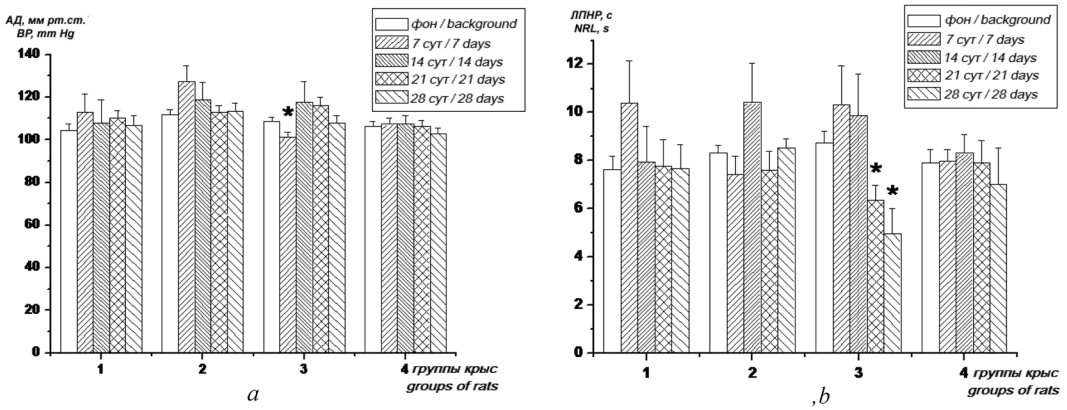
Мышечную силу крыс оценивали в тесте «Горизонтальная струна» [12, 13], навигационные навыки – в тесте «водный лабиринт Морриса» [14, 15]. Для оценки пассивно-оборонительного рефлекса применяли аналгезиметр Hotplate LE 7406 (Stoelting, США). Моделью ноцицептивной реакции служило тепловое воздействие ($t = 55$ °С) на конечности животных согласно стандартной методике [16]. Измерение уровня системного артериального давления (АД) проводили в регионе хвостовой артерии с помощью компьютеризированного неинвазивного регистратора АД для мелких лабораторных животных (PanLab, Испания).

Мониторинг регистрируемых показателей проводили предварительно и на 7, 14, 21 и 28-е сутки после манипуляций. Через 10 сут осуществляли контроль миграции стволовых клеток, меченных флуоресцирующим маркером. С этой целью у 3 крыс из каждой группы выделяли на ледяной бане головной мозг и производили серийные срезы с помощью криостата HM525 (Германия). Визуализацию осуществляли с применением флуоресцентного микроскопа.

Статистическую значимость полученных результатов оценивали при помощи критерия Манна–Уитни для непараметрических выборок и парного теста Уилкоксона и представляли в виде M ± m. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для построения графиков использовали программу Origin-6.1.

Результаты и их обсуждение. К 7-м суткам после операции только унилатеральное извлечение CA1 области гиппокампа сопровождалось снижением уровня АД на 15 % ($p < 0,05$, рис. 2, *a*). При этом укорочение латентного периода ноцицептивных рефлексов на 21-е и 28-е сутки регистрации (на 27 и 43 % соответственно, $p < 0,05$, рис. 2, *b*) свидетельствовало о наличии реорганизации в нейронных сетях головного мозга в период восстановления после травмы и формировании нового паттерна ответов на термический стимул (рис. 2). Трепанация и инъекции МСК без и после предварительного моделирования травмы на регистрируемые показатели значимо не влияли.

В исследованиях, проведенных ранее [8], установлено, что в поврежденных участках мозга МСК начинают накапливаться через 1 или 24 ч путем периневральной миграции после имплантации в подслизистое пространство полости носа крыс [6, 8]. Через 10 сут у животных второй



a ,*b*

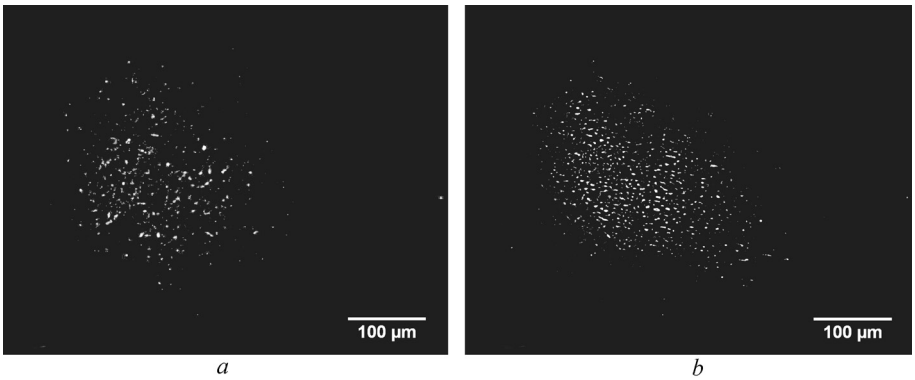
Рис. 2. Динамика уровня системного артериального давления (*a*) и латентный период ноцицептивных рефлексов (*b*) у крыс (*1* – трепанация ($n = 5$); *2* – унилатеральное извлечение CA1 области гиппокампа и последующая инъекция мезенхимальных стволовых клеток в подслизистые оболочки полости носа ($n = 5$); *3* – унилатеральное извлечение CA1 области гиппокампа ($n = 5$); *4* – инъекция мезенхимальных стволовых клеток в подслизистые оболочки полости носа ($n = 5$). * – $p < 0,05$ по отношению к фоновым показателям группы

Fig. 2. Changes in the level of systemic blood pressure (*a*) and nociceptive reaction latency (*b*) in rats (*1* – trepanation ($n = 5$), *2* – extraction of the unilateral CA1 hippocampus region and the subsequent injection of mesenchymal stem cells in the sub-mucosal membrane of the nasal cavity ($n = 5$), *3* – recovery unilateral CA1 hippocampus region ($n = 5$), *4* – injection of mesenchymal stem cells in the sub-mucosal membrane of the nasal cavity ($n = 5$). * – $p < 0.05$ with respect to the background values of the group

и пятой групп в обонятельных луковицах и области извлечения гиппокампа оценивали миграцию МСК.

Единичные флуоресцирующие клетки локализовались в лобных долях коры головного мозга крыс. Некоторое количество МСК визуализировано в области трепанации (кора больших полушарий).

На рис. 3 проиллюстрировано расположение МСК клеток в CA1 области гиппокампа. При проведении микроскопического исследования максимальное наличие флуоресцирующих клеток зафиксировано в области повреждения. Индекс Hscore у животных без операционных вмешательств составил 125,8 ± 6,1 %, а у особей после унилатерального извлечения CA1 области гиппокампа – 155,9 ± 3,2 % ($p < 0,05$). Диффузное распределение МСК в различные отделы головного мозга крыс без повреждений в области гиппокампа послужило обоснованием необходимости проведения прецизионной количественной оценки мигрирующих аллогенных МСК (результаты будут представлены в дальнейших работах).



a *b*

Рис. 3. Визуализация мезенхимальных стволовых клеток, меченных PKH67 (белое свечение), в участке CA1 области гиппокампа через 10 сут после их миграции из подслизистых оболочек полостей носа у животных второй (*a*) и пятой (*b*) экспериментальных групп (по 3 особи в каждой)

Fig. 3. Visualization of mesenchymal stem cells labeled with PKH67 (white light), in the area of the CA1 hippocampus region in 10 days after their migration from the nasal sub-mucosa second cavities in animals (*a*) and the fifth (*b*) experimental groups (3 individuals in each group)

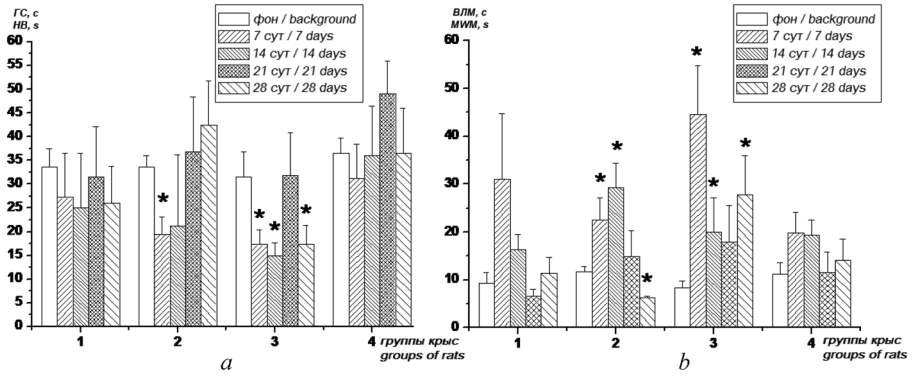


Рис. 4. Динамика времени фиксации на струне в тесте «Горизонтальная струна» (*a*) и латентного периода освобождения в тесте «водный лабиринт Морриса» (*b*) у крыс. Обозначения, как на рис. 2

Fig. 4. Dynamics of the fixation time on the cord in the test "Horizontal Bar" (*a*) and release of the latent period in the test "Morris water maze" (*b*) in rats. Symbols as in Fig. 2

По сравнению с результатами животных контрольной, а также первой и четвертой экспериментальных групп уменьшение латентного времени удержания на струне отмечалось у животных второй (на 7-е сутки – на 42 % по отношению к фоновым показателям, $p < 0{,}05$) и третьей (на 7-е сутки – на 45 %, на 14-е – на 53, на 28-е – на 45 % по отношению к фоновым показателям, $p < 0{,}05$) групп (рис. 4, *a*). В данном тесте можно оценивать не только мышечную силу, но и когнитивные функции, в основном при перемещении со струны на борта конструкции. Путем увеличения высоты бортов такая возможность нами исключена. У интактных животных выявлено достоверное по сравнению с первой регистрацией (15,3 ± 5,7 с) увеличение времени удержания на струне: после ежедневного повторения теста в течение 3 сут оно составило 33,2 ± 5,4 с, $p < 0{,}05$. Оценка данного показателя еженедельно значимых изменений не выявила.

У интактных крыс время достижения платформы по сравнению с первой регистрацией (34,7 ± 8,1 с) после ежедневного повторения теста в течение 3 сут сократилось (10,1 ± 2,3 с, $p < 0{,}05$) и при еженедельной регистрации практически не изменялось. Время достижения платформы (латентный период освобождения в тесте «водный лабиринт Морриса») животными второй и третьей групп при регистрации на 7-е и 14-е сутки превышало показатели других исследуемых особей (рис. 4, *b*). После деструкции CA1 области гиппокампа наблюдали двукратное увеличение регистрируемого показателя, особенно отчетливо проявившееся на 7-е сутки ($p < 0{,}05$). Увеличение периода нахождения платформы по сравнению с фоном и стабилизацию его повышенного уровня на 14, 21 и 28-е сутки, а также изменение температурной чувствительности у этих же животных (рис. 2, *b*) можно отнести к симптоматическому проявлению инсульта [5, 7]. Поскольку до 28-х суток у животных третьей группы так и не зафиксированы прежние достижения, но успешно стабилизировались результаты при более длительном достижении ими цели, можно судить о своеобразном восстановлении навигационных навыков и об изменении взаимодействия между участками коры больших полушарий (моторной коры) и лимбической системы. Применение МСК через 10 мин после травмы гиппокампа к 28-м суткам сопровождалось оптимизацией времени нахождения платформы представителями этой группы крыс по сравнению с другими экспериментальными особями. Таким образом, в обоих случаях на интегративном уровне проявляются процессы реорганизации самих нейронных сетей в CA1 области гиппокампа и их функциональных связей со структурами головного мозга. В дальнейших исследованиях целесообразно проверить гипотезу о наличии взаимодействия МСК и «клеток места» (*place cells*) гиппокампа.

Заключение. Введение МСК в подслизистое пространство полостей носа крыс через 10 мин после унилатеральной деструкции путем аспирации 20 мкл ткани CA1 области гиппокампа сопровождается восстановлением жизненно важных функций, а также выработанных ранее рефлексов защитного и ориентировочного характера в целом на одну неделю раньше, чем у крыс, которым после аналогичных деструкций мозга не вводили МСК в подслизистые оболочки полостей носа.

Список использованных источников

1. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells / J. G. Emsley [et al.] // Progress in Neurobiol. – 2005. – Vol. 75. – P. 321–341.

2. Jacobs, B. L. Adult brain neurogenesis and depression / B. L. Jacobs // Brain, Behavior, and Immunity. – 2002. – Vol. 16. – P. 602–609.

3. Lin, R. Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair / R. Lin, L. Iacovitti // Brain Res. – 2015. – Vol. 1628. – P. 327–342.

4. Sun, D. Endogenous neurogenic cell response in the mature mammalian brain following traumatic injury / D. Sun // Experim. Neurol. – 2016. – Vol. 275. – P. 405–410.

5. Downregulation of survivin regulates adult hippocampal neurogenesis and apoptosis, and inhibits spatial learning and memory following traumatic brain injury / Z. Zhang [et al.] // Neuroscience. – 2015. – Vol. 300. – P. 219–228.

6. Stukach, Y. P. Experimental substantiation of stem cells delivery to the brain through cerebral nerves endings / Y. P. Stukach, Y. G. Shanko, V. A. Kulchitsky // "Biological Motility": materials of the XI Inter. sci. symp. – Pushchino, 2016. – P. 232–235.

7. Богдан, В. Г. Выбор внеклеточной матрицы многокомпонентного биологического трансплантата с мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани для пластики обширных дефектов передней брюшной стенки / В. Г. Богдан, М. М. Зафранская, Ю. М. Гаин // Воен. медицина. – 2014. – № 1. – С. 88–93.

8. Стукач, Ю. П. Экспериментальное обоснование альтернативных путей доставки стволовых клеток в мозг / Ю. П. Стукач // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2015. – № 6. – С. 86–90.

9. Белоусов, Ю. Б. Этическая экспертиза биомедицинских исследований: практ. рекомендации / Ю. Б. Белоусов. – М.: ОКИ, 2005. – 157 с.

10. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg: Europ. Treaty Series, 1986. – N 123. – 48 p.

11. Paxinos, Y. The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates / Y. Paxinos, C. Watson. – San Diego: Academic Press, 1998. – 256 p.

12. Crawley, J. N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice / J. N. Crawley // Neuron. – 2008. – Vol. 57, N 6. – P. 809–818.

13. Karl, T. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research / T. Karl, R. Pabst, S. von Hörsten // Exp. Toxicol. Pathol. – 2003. – Vol. 55, N 1. – P. 69–83.

14. D'Hooge, R. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory / R. D'Hooge, P. P. De Deyn // Brain Res. Rev. – 2001. – Vol. 36, N 1. – P. 60–90.

15. Morris, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues / R. G. M. Morris // Learning and Motivation. – 1981. – Vol. 12, N 2. – P. 239–260.

16. *In vivo* модели для изучения анальгетической активности / Д. А. Бондаренко [и др.] // Биомедицина. – 2011. – Т. 1, № 2. – С. 84–94.

References

1. Emsley J. G., Mitchell B. D., Kempermann G., Macklis J. D. "Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells", *Progress in Neurobiology*, 2005, vol. 75, pp. 321–341.

2. Jacobs B. L. "Adult brain neurogenesis and depression", *Brain, Behavior, and Immunity*, 2002, vol. 16, pp. 602–609.

3. Lin R., Iacovitti L. "Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair", *Brain research*, 2015, vol. 1628, pp. 327–342.

4. Sun D. "Endogenous neurogenic cell response in the mature mammalian brain following traumatic injury", *Experimental Neurology*, 2016, vol. 275, pp. 405–410.

5. Zhang Z., Wang H., Jin Z., Cai X., Gao N., Cui X., Liu P., Zhang J., Yang S., Yang X. "Downregulation of survivin regulates adult hippocampal neurogenesis and apoptosis, and inhibits spatial learning and memory following traumatic brain injury", *Neuroscience*, 2015, vol. 300, pp. 219–228.

6. Stukach Y. P., Shanko Y. G., Kulchitsky V. A. "Experimental substantiation of stem cells delivery to the brain through cerebral nerves endings", *"Biological Motility": materials of the XI International scientific symposium*, Pushchino, 2016, vol. 1, pp. 232–235.

7. Bogdan V. G., Zafranskaya M. M., Gain Yu. M. "Choice of an extracellular matrix of a multicomponent biological graft with mesenchymal stem cells of fat tissue for plastics of big defects of the anterior abdominal wall", *Voennaya meditsina* [Military medicine], 2014, no. 1, pp. 88–93.

8. Stukach Yu. P. "Experimental substantiation of the alternative ways of the delivery of stem cells into the brain", *Doklady Natsionalnoi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2015, no. 6, pp. 86–90.

9. Belousov Yu. B. *Eticheskaya ekspertiza biomeditsinskikh issledovanii: prakticheskie rekomendatsii* [Ethical expertise of the biomedical investigations: practical recommendations], Moscow, RU, 2005, 157 p.

10. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, European Treaty Series, no. 123, Strasbourg, FR, 1986.

11. Paxinos Y., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, US, 1998.

12. Crawley J. N. “Behavioral phenotyping strategies for mutant mice”, *Neuron*, 2008, vol. 57, no. 6, pp. 09–818.

13. Karl T., Pabst R., von Hörsten S. “Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research”, *Experimental Toxicological Pathology*, 2003, vol. 55, no. 1, pp. 69–83.

14. D’Hooge R., De Deyn P. P. “Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory”, *Brain Research Reviews*, 2001, vol. 36, no. 1, pp. 60–90.

15. Morris R. G. M. “Spatial localization does not require the presence of local cues”, *Learning and Motivation*, 1981, vol. 12, no. 2, pp. 239–260.

16. Bondarenko D. A., D’yachenko I. A., Skobtsov D. I., Murashev A. N. “*In vivo* models for investigation of the anasgesic activity”, *Biomeditsina* [Biomedicine], 2011, vol. 1, no. 2, pp. 84–94.

Информация об авторах

Пашкевич Светлана Георгиевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: skypasht@mail.ru

Токальчик Дмитрий Павлович – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: fossil1991@mail.ru

Миронова Галина Павловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: skypasht@mail.ru

Досина Маргарита Олеговна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pochta_margo@mail.ru

Тихонович Ольга Геннадьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tixon-ol@mail.ru

Стукач Юлия Павловна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: stukachyulya@gmail.com

Калюнов Владимир Николаевич – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь)

Для цитирования

Реализация жизненно важных функций крыс в условиях реорганизации нейронных сетей гиппокампа мезенхимальными стволовыми клетками / С. Г. Пашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 111–117.

Information about the authors

Pashkevich Svetlana Georgievna – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: skypasht@mail.ru

Tokalchik Dmitri Pavlovich – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: fossil1991@mail.ru

Mironova Galina Pavlovna – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus)

Dosina Margarita Olegovna – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pochta_margo@mail.ru

Tichonovich Olga Gennadyevna – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tixon-ol@mail.ru

Stukach Yliya Pavlovna – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: stukachyulya@gmail.com

Kalyunov Vladimir Nikolaevich – D. Sc. (Biol.), Chief researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus)

For citation

Pashkevich S. G., Tokalchik D. P., Mironova G. P., Dosina M. O., Tichonovich O. G., Stukach Yu. P., Kalyunov V. N. “The implementation of vital functions in rats after the reorganization of the neural network of the hippocampus by mesenchymal stem cells”. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 111–117.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616.314-089.843:616.316-008.8-07

Поступила в редакцию 28.12.2016
Received 28.12.2016

Т. Л. Шевела, И. О. Походенько-Чудакова

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К *HELICOBACTER PYLORI* В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ПЕРИИМПЛАНТИТОМ

Изучена эффективность иммунохроматографического теста для определения антител к *Helicobacter pylori* в ротовой жидкости у 274 пациентов с периимплантитом. Все пациенты были разделены на две группы. Первая группа включала 248 лиц с остеоинтегрированными имплантатами, вторая группа – 26 пациентов, у которых на основании клинической картины и по данным лучевых методов исследования верифицирован диагноз периимплантит. По результатам исследования цельной крови положительный тест на *Helicobacter pylori* был у 8 % лиц первой группы и у 85 % пациентов второй группы. В то же время при исследовании ротовой жидкости тест был положителен у 15 % лиц первой группы и у 100 % пациентов второй группы. Следовательно, носительство *Helicobacter pylori* является одним из факторов развития периимплантита и должно расцениваться как относительное противопоказание к проведению операции дентальной имплантации. Представленный материал убедительно свидетельствует об эффективности иммунохроматографического теста для определения антител к *Helicobacter pylori* в ротовой жидкости у пациентов с периимплантитом.

Ключевые слова: периимплантит, *Helicobacter pylori*, иммунохроматографический тест, ротовая жидкость.

T. L. Shevela, I. O. Pohodenko-Chudakova

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

IMMUNOASSAY EFFECTIVENESS FOR DETERMINING OF ANTIBODIES TO *HELICOBACTER PYLORI* IN THE ORAL FLUID OF PATIENTS WITH PERIIMPLANTITIS

The aim is to determine the immunoassay effectiveness for determination of antibodies to *Helicobacter pylori* in the oral fluid of patients with periimplantitis.

We examined 274 patients. The first group included 248 patients with osteointegrated implants. The second group of 26 patients had the diagnosis of the periimplantitis on the basis of clinical data and the radiological methods. A positive test for *Helicobacter pylori* according to whole blood was determined in 8 % of patients of the 1st group and in 85 % of the 2nd group. While according to the oral fluid, the test results were positive in 15 % of patients of the 1st group and 100 % patients of the 2nd group. Consequently, the *Helicobacter pylori* is one of the factors in the development of periimplantitis and should be considered as a relative contraindication to the operation of dental implantation. The presented material confirms the immunoassay effectiveness for determination of antibodies to *Helicobacter pylori* in the oral fluid of patients with periimplantitis.

Keywords: periimplantitis, *Helicobacter pylori*, immunoassay, oral fluid.

Введение. Эффективное комплексное лечение пациентов после операции дентальной имплантации предполагает назначение лекарственных противомикробных средств. Развитие же периимплантита после проведенного лечения связано с резистентностью микрофлоры как к антибиотикам, так и к ее видовым составам [1]. Поскольку известно, что одним из ведущих этиологических факторов в развитии периимплантита являются микроорганизмы [2], важным представляется определение состава микрофлоры в очагах воспаления для выбора оптимального противомикробного лечения [3].

На современном этапе применяют методы диагностики, позволяющие установить качественный и количественный состав микрофлоры. Для последующего целенаправленного назначения антибактериальной терапии представляется целесообразным определение видового состава микрофлоры до проведения операции.

К методам микробиологического исследования относят полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и масс-спектрометрию [4]. ПЦР-диагностика дает возможность обнаружить ДНК микроорганизмов, которые не всегда удается культивировать. Данное исследование предполагает трех-

© Шевела Т. Л., Походенько-Чудакова И. О., 2017

этапный циклический процесс, в результате которого многократно увеличивается количество специфического фрагмента ДНК. Методика осуществляется с применением набора праймеров для определения микрофлоры и характеризуется как качественная, но дорогостоящая [5].

Масс-спектрометрия – высокоточная методика, позволяющая установить видовую принадлежность всех жизнеспособных и культивируемых бактериальных форм. Этот физический метод измерения выполняется с помощью прибора, способного в условиях вакуума разделять находящееся в газовой фазе заряженные частицы вещества согласно соотношению их массы и заряда.

В то же время в ряде публикаций полость рта рассматривается как естественный резервуар *Helicobacter pylori* (HP) [6]. При этом указанный микроорганизм представляет собой основную причину реинфицирования слизистой оболочки желудка [7]. В других работах подчеркивается осложненное течение заболеваний пародонта у HP-инфицированных пациентов [6].

Каждый из методов выявления HP имеет свои преимущества и недостатки, а также отличается чувствительностью и специфичностью. Многочисленные сравнительные исследования показали, что результаты, полученные с применением различных методов, не всегда идентичны. На основании этого пришли к выводу о необходимости одновременного использования двух, а иногда и трех методов с целью исключения ложнонегативных или ложнопозитивных показателей [8]. При этом результат следует считать положительным или отрицательным при совпадении показателей всех примененных методов исследования.

При диагностике инфицирования HP у пациентов применяют как инвазивные, так и неинвазивные методы. Инвазивный метод связан с забором образца ткани (биопсией) желудка или двенадцатиперстной кишки и последующим определением уреазы, культивированием или гистологическим окрашиванием взятого материала. Неинвазивные методы включают тест на мочевину в выдыхаемом воздухе, что требует применения дорогостоящего лабораторного оборудования и умеренного воздействия радиоактивными изотопами. Кроме того, существуют серологические методы, основанные на образовании антител к HP, что строго коррелирует с гистологически подтвержденной инфекцией [9]. Недостатком данных методик является отсутствие селективности в отношении штаммов HP и, как следствие, увеличение вероятности получения ложноположительных результатов.

В амбулаторной практике применяется диагностический мембранный метод тест-кассеты, который является иммунохроматографическим тестом и предназначен для быстрого и качественного определения антител к HP (цельная кровь/сыворотка/плазма). Метод тест-кассеты является простым, легковоспроизводимым тестом, в котором используется сочетание частиц, покрытых антигеном HP, и антител к человеческому IgG для качественного и селективного определения антител к HP в цельной крови, сыворотке и плазме.

Согласно данной методике, цельная кровь, забранная из пальца, вступает в реакцию с частицами, покрытыми антигеном HP. Далее забранная кровь с этими частицами взаимодействует с реагентами, нанесенными на тест-кассету, вызывая капиллярное увлажнение мембраны.

Полученные данные интерпретируют в соответствии с окрашиванием линий на кассете. Положительный результат (образец содержит антитела к HP) характеризуется двумя окрашенными линиями: одной – на участке полоски контроля, другой – на участке тестовой полоски. При этом интенсивность окрашенной тестовой полоски может варьироваться в зависимости от концентрации антител к HP, присутствующих в пробе. Отрицательный результат определяется, если образец не содержит антител к HP, на что указывает наличие одной окрашенной полоски – линии контроля. При этом следует подчеркнуть, что, как и применении других диагностических тестов, все результаты рассматриваются совместно с остальной клинической информацией.

В ротовой жидкости до настоящего времени идентифицировано 23 вируса. Они выделены в образцах указанного биологического субстрата по степени реактивности антител, обнаружению антигена или выделению нуклеиновой кислоты методом ПЦР-анализа. Это вирусы герпеса, гепатита А, В и С, ВИЧ-инфекции, папилломы человека, гриппа и полиомиелита. Помимо вирусов в ротовой жидкости определяется 14 бактериальных штаммов, а именно *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum* и множество разновидностей стрептококковых [10].

Цель работы – определить эффективность иммунохроматографического метода выявления антител к *Helicobacter pylori* в ротовой жидкости пациентов с периимплантитом.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования на предмет носительства HP служила цельная кровь, забранная из пальца, и ротовая жидкость274 пациентов с остеоинтегрированными имплантатами и лиц с периимплантитом.

Все пациенты были рандомизированно разделены на две группы, сопоставимые по демографическим, нозологическим показателям. Первая группа включала 248 пациентов с остеоинтегрированными имплантатами, вторая – 26 лиц, у которых на основании клинической картины и по результатам лучевых методов исследования верифицирован диагноз периимплантит. Лица, принадлежавшие ко второй клинической группе, предъявляли жалобы на боли при жевании в области установленных имплантатов, подвижность последних. При осмотре полости рта в зоне развития воспалительно-деструктивного осложнения отмечали отек, кровоточивость при зондировании десневой манжетки, присутствие отделяемого из кармана, наличие свища на слизистой оболочке десны, подвижность имплантата. Результаты лучевых методов исследования указывали на снижение горизонтального уровня костной ткани в области имплантата, наличие вертикальных дефектов кости.

После верификации диагноза все дезинтегрированные дентальные имплантаты удаляли.

Для определения антител к HP в ротовой жидкости пациентов обеих групп использовали диагностический иммунохроматографический мембранный метод тест-кассеты в соответствии с предложенным авторами способом. Для этого утром, натощак, не ранее чем через 30 мин после чистки зубов осуществляли забор ротовой жидкости (путем ее сплевывания) в стерильные пробирки. Затем исследуемый биологический материал наносили на тест-кассету при помощи пипетки, после чего происходило капиллярное увлажнение мембраны. Результат оценивали через 10 мин. Наличие антител к HP, определяемое по окрашиванию двух линий на кассете, указывало на положительный результат. Если в исследуемом материале антитела к HP отсутствовали (наличие одной окрашенной полоски), результат считали отрицательным.

Результаты и их обсуждение. При сравнении полученных результатов анализа цельной крови у пациентов двух групп констатировали следующее. Положительный результат (образец содержал антитела к HP) в первой группе констатировали у 19 (8 %) пациентов, во второй группе − у 22 (85 %). При этом интенсивность окрашенной тестовой полоски варьировалась в зависимости от концентрации антител к HP, присутствующих в пробе. Отрицательный результат в первой группе был констатирован в 92 % наблюдений, а во второй группе − только в 8 %.

Анализ результатов ротовой жидкости выявил содержание антител к HP у 37 (15 %) пациентов первой группы и у 26 (100 %) лиц второй группы.

Полученные результаты дают основание считать, что определенную роль в развитии периимплантита в организме пациентов играет присутствие HP.

Известно, что развитие инфекционного процесса в костной ткани, непосредственно прилежащей к дентальному имплантату, является одной из основных причин дезинтеграции, а затем и удаления последнего. При этом важной задачей является установление причины развития воспалительно-деструктивных изменений в тканях, непосредственно прилежащих к дентальному имплантату. Успешное решение данной задачи способствует не только своевременному купированию воспалительно-деструктивного процесса, но во многом определяет возможность дальнейшего функционирования дентального имплантата в заинтересованной зоне. В то же время существует точка зрения, что периимплантит вызывает определенная микрофлора, в том числе присутствующая в полости рта в норме [11]. Однако в специальной отечественной и зарубежной литературе работы, посвященные исследованиям данной направленности, единичны, а их данные весьма противоречивы. В связи с этим полученные новые данные имеют не только фундаментальное, но и выраженное прикладное значение и определенным образом восполняют существующий пробел в знаниях по данному вопросу. Кроме того, они могут представлять один из ключевых моментов для успешного решения задач по прогнозированию, профилактике и лечению воспалительно-деструктивных осложнений после дентальной имплантации.

Следовательно, носительство HP является одним из факторов развития периимплантита и должно расцениваться как относительное противопоказание к проведению операции дентальной

ной имплантации. Указанная клиническая ситуация может быть скорректирована при помощи этиотропной противомикробной терапии, что позволит предупредить развитие осложнений в послеоперационном периоде.

Заключение. Представленный материал убедительно свидетельствует об эффективности иммунохроматографического теста для определения антител к *Helicobacter pylori* в ротовой жидкости у пациентов с периимплантитом.

Список использованных источников

1. Гударьян, А. А. Роль аэробной и анаэробной микрофлоры в развитии дентального мукозита и дентального периимплантита / А. А. Гударьян // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Т. 1, № 2. – С. 132−135.

2. Clinical, microbiological and immunological findings in peri-implants patients with bar-retained removable partial dentures, compared to a healthy control group (12-month-follow-up) / C. Mesmer [et al.] // Fogorv. Sz. – 2012. − N 105. – P. 59−64.

3. Вавилова, Т. П. Слюна. Аналитические возможности и перспективы / Т. П. Вавилова, О. О. Янушевич, И. Г. Островская. – М.: БИНОМ, 2014. – 312 с.

4. Гажва, С. И. Комплексное лечение заболеваний слизистой оболочки полости рта у пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта / С. И. Гажва, О. В. Шкаредная // Пародонтология. − 2012. − № 4 (65). − С. 62−65.

5. Косюга, С. Ю. Клинический случай десквамативного глоссита у пациента со слабой степенью обсемененности желудка *Helicobacterpylori* / С. Ю. Косюго, Л. М. Лукиных, С. Э. Варванина // Клин. стоматология. – 2015. − № 2. – С. 10−13.

6. Нейзберг, Д. М. Роль эктопических очагов *Helicobacterpylori* при хроническом генерализованном пародонтите / Д. М. Нейзберг, И. Ю. Стюф // Пародонтология. – 2011. − № 2 (59). – С. 9−13.

7. Wirth, H. P. Dyspepsia. Ulcer disease − Helicobacter pylori. Gastroesophageal reflux disease / H. P. Wirth // Praxis. – 2016. Vol. 105, N 12. – P. 693−700.

8. Шварц, Ф. Периимплантит: этиология, диагностика и лечение / Ф. Шварц, Ю. Бекер. – Львов: ГалДент, 2014. – 282 с.

9. A controlled, cross-sectional exploratory study on markers for the plasminogen system and inflammation in crevicular fluid samples from healthy, mucositis and periimplantitis sites / J. Hall [et al.] // Eur. J. Oral Implantol. – 2015. – Vol. 8, N 2. – P. 153−166.

10. Diagnosis and epidemiology of Helicobacter pylori infection / X. Calvet [etal.] // Helicobacter. – 2013. – N 18. – P. 5−11.

11. Burrows, R. S. Risk factors in implant treatment planning / R. S. Burrows // Eur. J. for Dental Implantologists. – 2013. – Vol. 9, N 1. – P. 74–79.

References

1. Gudar'yan A. A. "The role of aerobic and anaerobic microflora in the development of dental mucositis and peri-implantitis dental", *Visnik problem biologii i meditsini* [Bulletin problems of biology and medicine], 2014, vol. 1, no. 2, pp. 132−135.

2. Mesmer C., Forster A., Antal M., Nagy K. "Clinical, microbiological and immunological findings in peri-implants patients with bar-retained removable partial dentures, compared to a healthy control group (12-month-follow-up)", *Fogorvosi Szemle*, 2012, no. 105, pp. 59−64.

3. Vavilova T. P., Yanushevich O. O., Ostrovskaya I. G. *Slyuna. Analiticheskie vozmozhnosti i perspektivy* [Saliva. Analytical possibilities and perspectives], Izdatel'stvo BINOM, Moscow, RU, 2014.

4. Gazhva S. I., Shkarednaya O. V. "Multimodality treatment of diseases of oral mucosa of patients with the digestive tract pathology", *Parodontologiya* [Periodontology], 2012, no. 4 (65), pp. 62−65.

5. Kosyuga S. Yu., Lukinykh L. M., Varvanina S. E. "Case desquamative glossitis in a patient with a low degree of contamination of the stomach Helicobacterpylori", *Klinicheskaya stomatologiya* [Clinical Dentistry], 2015, no. 2, pp. 10−13.

6. Neizberg D. M., Styuf I. Yu. "Role of ectopic foci of *Helicobacter pylori* at chronic generalized periodontitis", *Parodontologiya* [Periodontology], 2011, no. 2 (59), pp. 9−13.

7. Wirth H. P. "Dyspepsia. Ulcer disease − Helicobacter pylori. Gastroesophageal reflux disease", *Praxis*, 2016, vol. 105, no. 12, pp. 693−700.

8. Shvarts F., Beker Yu. *Periimplantit: etiologiya, diagnostika i lechenie* [Periimplantitis: etiology, diagnosis and treatment], Izd. GalDent, L'vov, UA, 2014.

9. Hall J., Pehrson N., Ekestubbe A., Jemt T., Friberg B. "A controlled, cross-sectional exploratory study on markers for the plasminogen system and inflammation in crevicular fluid samples from healthy, mucositis and periimplantitis sites", *European Journal of Oral Implantology*, 2015, vol. 8, no. 2, pp. 153−166.

10. Calvet X., Ramırez Lazaro M. J., Lehours P., Megraud F. "Diagnosis and epidemiology of Helicobacter pylori infection", *Helicobacter*, 2013, no. 18, pp. 5−11.

11. Burrows R. S. "Risk factors in implant treatment planning. Case study of a patient with two missing lower incisors", *European Journal for Dental Implantologists*, 2013, vol. 9, no. 1, pp. 74–79.

Информация об авторах

Шевела Татьяна Леонидовна – канд.мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shevelatatyana@mail.ru

Походенько-Чудакова Ирина Олеговна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ip-c@yandex.ru

Для цитирования

Шевела, Т. Л. Эффективность иммунохроматографического определения антител к *Helicobacter pylori* в ротовой жидкости пациентов с периимплантитом / Т. Л. Шевела, И. О. Походенько-Чудакова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 118–122.

Information about the authors

Shevela Tat'yana Leonidovna – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: *patfiz@bsmu.by*

Pohodenko-Chudakova Irina Olegovna – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: *patfiz@bsmu.by*

For citation

Shevela T. L., Pohodenko-Chudakova I. O. "The effectiveness of immunoassay for determining of antibodies to *Helicobacter pylori* in the oral fluid of patients with peri-implantitis". *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 118–122.

ISSN 1814-6023 (print)
УДК 616.89-008.441.13:618.33

Поступила в редакцию 16.08.2016
Received 16.08.2016

Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНЕЛЛОГЕНЕЗА В НЕЙРОНАХ КОРЫ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Пренатальная алкоголизация сопровождается нарушениями развития органелл внутренних пирамидных нейронов фронтальной коры в постнатальном онтогенезе, что соответствует структурным и гистохимическим дефектам, обнаруживаемым на светооптическом уровне. Выявленные нарушения органеллогенеза пирамидных нейронов коры мозга предположительно являются основой неврологических и поведенческих нарушений у животных после пренатальной алкоголизации.

Ключевые слова: пренатальная алкоголизация, органеллогенез, пирамидные нейроны.

E. I. Bon, S. M. Zimatkin

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

ORGANELLOGENESIS FEATURES IN THE NEURONS OF THE CEREBRAL CORTEX OF RATS AFTER PRENATAL ALCOHOLIZATION

The prenatal alcoholization has resulted in significant qualitative and quantitative disorders of organelles in the internal pyramidal neurons in the frontal cortex during postnatal ontogenesis, which corresponds to the structural and histochemical defects to be identified at the light-optical level. The revealed disorders of organellogenesis in the pyramidal neurons of the cerebral cortex may underlie the known irreversible neurological and behavioral disturbances in animals after prenatal alcoholization.

Keywords: prenatal alcoholization, organellogenesis, pyramidal neurons.

Введение. Пренатальная алкоголизация сопровождается развитием ряда специфических нарушений в организме плода, объединяемых в понятие «фетальный алкогольный синдром» (ФАС), входящий в «спектр нарушений плода, вызванных алкоголем» (fetal alcohol spectrum disorders, FASD) [1, 2]. Согласно сведениям литературы, кора головного мозга особенно чувствительна к пренатальному воздействию этанола, поскольку это воздействие сопровождается уменьшением числа и размеров пирамидных нейронов в коре мозга у животных, снижением в них содержания белка и недоразвитием цитоплазмы [3–5]. В проведенных ранее исследованиях на светооптическом уровне показано, что в коре мозга крысы происходит снижение относительного количества нейронов 5-го слоя коры, остановка их роста и сморщивание, что сопровождается истончением коры [5, 6]. Вместе с тем представляло интерес выяснить особенности формирования органелл в нейронах мозга в постнатальном онтогенезе после пренатальной алкоголизации с использованием ультраструктурной морфометрии и количественной гистохимии.

Цель настоящей работы – количественная ультраструктурная и гистохимическая оценка постнатального органеллогенеза во внутренних пирамидных нейронах фронтальной коры головного мозга крысы после пренатальной 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» [7]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 11.03.2014). Животные находились на стандартном рационе питания. Крысы опытной группы на протяжении всей беременности (от дня обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках до родов) получали 15 %-ный раствор этанола в ка-

© Бонь Е. И., Зиматкин С. М., 2017

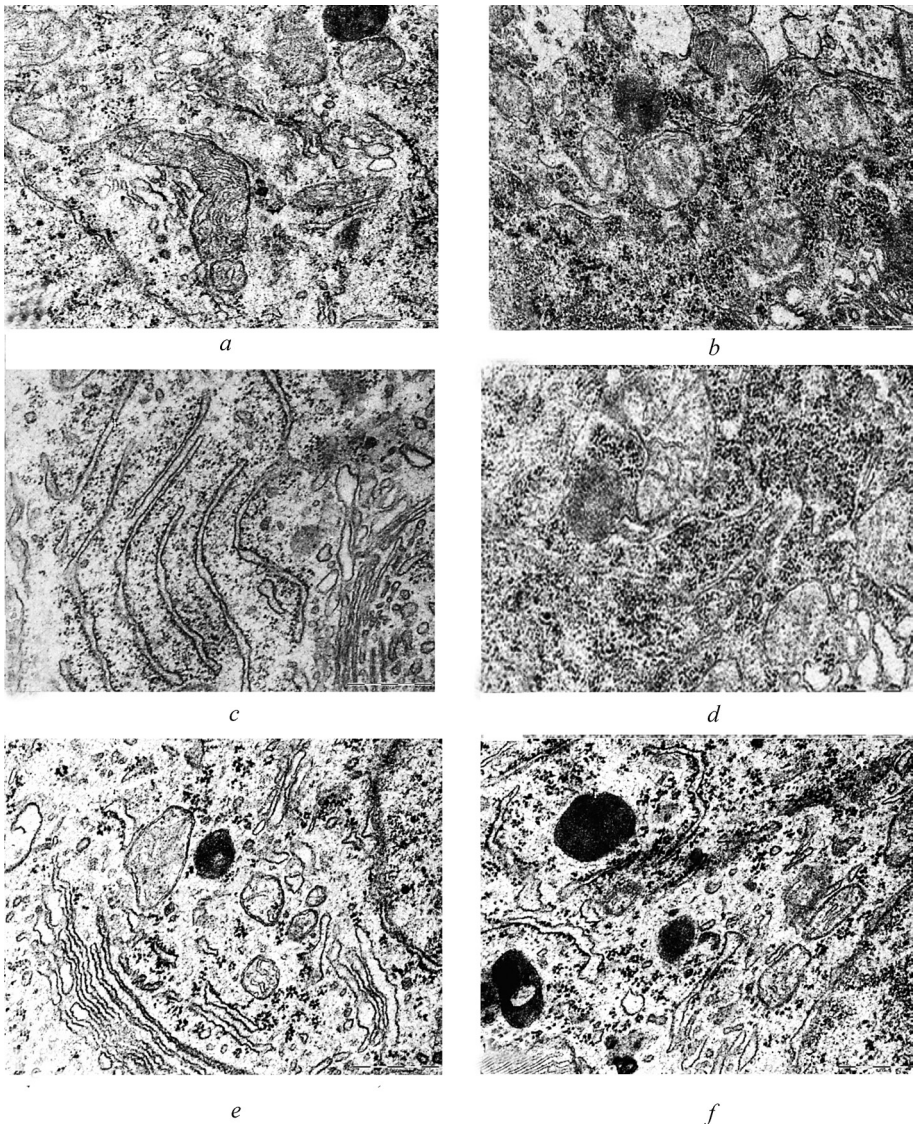
честве единственного источника питья, а животные контрольной группы – эквиобъемное количество воды. Среднее потребление алкоголя беременными самками составляло 4 ± 2 г/кг/сут. Забой крысят осуществляли на 5, 20 и 45-е сутки после рождения. Расположение фронтальной коры в гистологических препаратах головного мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [8]. После декапитации быстро извлекали головной мозг, кусочки переднего отдела коры больших полушарий фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1 %-ным толуидиновым синим по методу Ниссля и на выявление рибонуклеопротеинов (РНП) по Эйнарсону или замораживали в жидком азоте для определения активности ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ) и кислой фосфатазы (КФ). Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США).

Для электронно-микроскопического исследования вырезали нужные участки коры и помещали их в 1 %-ный осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (pH = 7,4) на 2 ч при температуре +4 ºС. Далее их промывали в смеси буфера Миллонига (20 мл) и сахарозы (900 мг), обезвоживали 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 заливочную смесь смол. Срезы изготавливали на ультрамикротоме МТ-7000 (RMC, США), собирали на опорные сеточки, контрастировали ацетатом урана и цитратом свинца. Полученные препараты изучали с помощью электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония) и фотографировали цифровой камерой Olympus Mega View III (OlympusSoftImagingSolutions, Германия). Ультраструктурную морфометрию проводили с помощью программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США), обводя курсором на мониторе компьютера митохондрии, лизосомы, гранулярную эндоплазматическую сеть, комплекс Гольджи и рибосомы, оценивая их количество, размеры и форму.

Полученные средние цифровые данные по каждому животному анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me), границы процентилей (от 25-го до 75-го) и интерквартильного диапазона (IQR). Количественные результаты представлены в виде медианы (Me (LQ; UQ), где LQ – верхняя граница нижнего квартиля, UQ – нижняя граница верхнего квартиля). Достоверными считали различия между сроками постнатального развития при значениях $p < 0,05$ (Mann–Whitney *U*-test).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что у крысят, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, количества митохондрий на единицу площади цитоплазмы на 20-е и 45-е сутки значительно меньше, чем в контроле. При этом митохондрии по размерам не отличались от контроля, но становились более сферичными и менее вытянутыми, а количество и длина крист на 1 мкм^2 митохондрий были ниже на 20-е и особенно на 45-е сутки после рождения (см. рисунок, табл. 1). В цитоплазме этих нейронов на 20-е и 45-е сутки после рождения активность маркерных ферментов митохондрий СДГ НАДН-ДГ также была значительно ниже таковой в контрольной группе (табл. 2).

Общее количество рибосом на единицу площади цитоплазмы нейронов и содержание РНП в цитоплазме животных, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, было несколько выше, чем в контроле (табл. 1, 2). На 5-е сутки после рождения в цитоплазме нейронов как контрольных, так и опытных животных преобладают свободные рибосомы (87,5 % от их количества). Затем их количество в цитоплазме нейронов контрольных крыс постепенно снижается и в них прогрессивно возрастает количество связанных с гранулярной эндоплазматической сетью (ГрЭС) рибосом. У пренатально алкоголизированных крыс относительное количество свободных рибосом прогрессивно нарастает, а связанных снижается, на 45-е сутки становясь в 5 раз меньше; при этом соотношение свободных и связанных рибосом у них в 10 раз меньше, чем у контрольных животных. На 45-е сутки после рождения в опытной группе происходило значительное снижение протяженности цистерн ГрЭС на единицу площади цитоплазмы и их расширение (см. рисунок,



Органеллы нейронов внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры крыс на 45-е сутки постнатального развития: *a*, *b* – митохондрии; *c*, *d* – ГрЭС; *e*, *f* – лизосомы (слева – контроль, справа – алкоголь). Электронограмма. ×50 000

Neurons organelles of the inner pyramidal layer of the frontal cortex of rats on the 45th day of postnatal development: *a*, *b* – mitochondria; *c*, *d* – RER; *e*, *f* – lysosomes (on the left – control, on the right – alcohol). Theelectronogram. × 50 000

табл. 1). В этот же срок у опытных животных значительно расширяются и цистерны комплекса Гольджи (см. рисунок, табл. 1).

Относительное количество лизосом на единицу площади цитоплазмы и их размеры у пренатально алкоголизированных крыс значительно увеличены начиная с 20-х суток постнатального развития (см. рисунок, табл. 1). Сходным образом в цитоплазме нейронов опытных крыс повышена и активность маркерного фермента лизосом КФ (табл. 2).

Таким образом, пренатальная алкоголизация сопровождается качественными и количественными нарушениями развития органелл внутренних пирамидных нейронов фронтальной коры в постнатальном онтогенезе. Так, происходит снижение относительного числа митохондрий, количества и длины их крист, что сопровождается снижением в цитоплазме этих нейронов активности маркерных ферментов митохондрий СДГ (фермента аэробного окисления углеводов в цикле Кребса) и НАДН-ДГ (митохондриального фермента, участвующего в переносе электронов и являющегося важным связующим звеном между конечными продуктами распада углеродного скелета и дыхательной цепью). Это свидетельствует о прогрессирующем ослаблении функциональной

Таблица 1. **Показатели ультрамикроскопической морфометрии органелл нейронов 5-го слоя коры мозга крыс (Me (LQ; UQ))**

Table 1. **Indices of ultramiscoscopic morphometry of the neurons organelles of the 5th layer of the frontal cortex of rats(Me (LQ; UQ))**

Показатель		5-е сутки		20-е сутки		45-е сутки	
		Контроль	Алкоголь	Контроль	Алкоголь	Контроль	Алкоголь
Митохондрии	к-во на 1 мкм^2	0,8 (0,6; 0,8)	0,8 (0,8; 1)	1,4 (1,4; 1,6)	1,1 (1; 1,2)*	1,9 (1,6; 2,2)	1,2 (1; 1,2)*
	средняя площадь, мкм^2	0,07 (0,07; 0,08)	0,076 (0,07; 0,08)	0,34 (0,3; 0,35)	0,3 (0,29; 0,34)	0,16 (0,15; 0,2)	0,19 (0,17; 0,19)
	форм-фактор, ед.	0,88 (0,87; 0,89)	0,9 (0,89; 0,9)	0,64 (0,6; 0,66)	0,82 (0,8; 0,9)*	0,62 (0,6; 0,64)	0,7 (0,68; 0,8)*
	фактор элонгации, ед.	1,37 (1,26; 1,5)	1,32 (1,3; 1,6)	4 (3; 4,5)	3 (2,6; 3,5)*	2,8 (2,76; 2,82)	2,6 (2,4; 2,7)*
	к-во крист на 1 мкм^2	53 (41; 53)	53 (27; 75)	39 (35; 40)	27 (21; 28)*	153 (125; 160)	63 (29; 79)*
	длина крист на 1 мкм^2	8 (6; 8)	8 (4; 11)	9,6 (8,8; 10)*	6 (5; 7)*	25 (25; 25)	13 (6; 16)*
	площадь, занимаемая в цитоплазме, %	6 (4; 6,4)	6 (5,9; 8)	50 (48; 60)	30 (29; 40)*	30 (24; 40)	20 (17; 23)*
Рибосомы	общее к-во на 1 мкм^2	15,6 (14,6; 16)	16,4 (16; 17,6)*	15,3 (14; 17)	16 (14; 18)	16 (14; 17)	16 (14; 17)
	к-во свободных на 1 мкм^2	13,8 (13; 14)	15 (14,8; 16)*	8,5 (8; 10)	14 (13; 15)*	7 (6; 7,4)	15 (13; 15)*
	к-во связанных на 1 мкм^2	1,6 (1,4; 1,8)	1,4 (1,2; 1,4)*	6,8 (6; 7)	2 (1,2; 2,2)*	9 (8; 9,2)	1,7 (1,2; 2)*
ГрЭС	длина цистерн, мкм	0,39 (0,38; 0,4)	0,43 (0,4; 0,6)*	1,1 (1; 1,1)	1,1 (1; 1,1)	2,2 (2; 2,2)	1,5 (1; 2)*
	ширина цистерн, мкм	0,035 (0,03; 0,04)	0,04 (0,03; 0,05)	0,1 (0,08; 0,1)	0,1 (0,09; 0,11)	0,07 (0,07; 0,074)	0,15 (0,1; 0,2)*
Комплекс Гольджи	ширина цистерн, мкм	0,15 (0,13; 0,17)	0,15 (0,14; 0,17)	0,1 (0,08; 0,11)	0,13 (0,12; 0,14)*	0,07 (0,06; 0,08)	0,15 (0,12; 0,17)*
Лизосомы	к-во на 1 мкм^2	0,2 (0,2; 0,2)	0,4 (0,4; 0,4)	0,8 (0,6; 0,8)	1,2 (1; 1,4)*	0,5 (0,4; 0,6)	1 (0,8; 1,2)*
	площадь, мкм^2	0,04 (0,037; 0,04)	0,045 (0,04; 0,05)	0,1 (0,08; 0,12)	0,16 (0,16; 0,17)*	0,1 (0,1; 0,11)	0,16 (0,16; 0,17)*
	площадь, занимаемая в цитоплазме, %	0,78 (0, 74; 0, 8)	1,8 (1,5; 2)	8 (5; 10)	19 (16; 20)*	5 (4; 7)	16 (13; 20)*

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

Т а б л и ц а 2. **Активность ферментов и содержание РНП в цитоплазме нейронов 5-го слоя фронтальной коры мозга крыс, ед. опт. плотн. (Me (LQ; UQ))**

T a b l e 2. **Ferment activity and the RNP content in the cytoplasma of the neurons of the 5th layer of the frontal cortex of rats, optical density units (Me (LQ; UQ))**

Группа	5-е сутки	20-е сутки	45-е сутки
Активность СДГ			
Контроль	–	0,14 (0,12; 0,16)	0,17 (0,16; 0,174)
Алкоголь	–	0,11 (0,1; 0,113)*	0,12 (0,116; 0,13)*
Активность НАДНДГ			
Контроль	0,156 (0,15; 0,17)	0,2 (0,2; 0,23)	0,24 (0,23; 0,26)
Алкоголь	0,16 (0,15; 0,17)	0,18 (0,17; 0,18)*	0,181 (0,18; 0,85)*
Содержание РНП			
Контроль	0,2 (0,18; 0,22)	0,14 (0,13; 0,15)	0,19(0,18; 0,2)
Алкоголь	0,26 (0,2; 0,28)*	0,16 (0,145; 0,165)	0,2(0,19; 0,21)
Активность кислой фосфатазы			
Контроль	–	0,24 (0,22; 0,28)	0,23 (0,22; 0,236)
Алкоголь	–	0,35 (0,34; 0,37)*	0,35 (0,34; 0,354)*

П р и м е ч а н и е. Активность фермента не определяется (ниже уровня чувствительности метода), * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

активности митохондрий и энергетического обеспечения нейронов коры мозга крыс, перенесших пренатальную алкоголизацию.

Прогрессирующее нарастание относительного числа свободных рибосом и уменьшение числа связанных рибосом в нейронах опытной группы свидетельствует о преобладании биосинтеза белка для интрамуральных потребностей нейронов, необходимого для повышенного обновления поврежденных органелл и выживания нейронов в неблагоприятных условиях. Однако из-за сниженного синтеза белка на экспорт и его транспорта в терминали участие этих нейронов в деятельности коры мозга, по-видимому, будет уменьшаться. Относительное количество лизосом на единицу площади цитоплазмы и их размеры увеличиваются в нейронах пренатально алкоголизированных крыс, что коррелирует с повышенной активностью в их цитоплазме маркерного фермента лизосом КФ и отражает нарастание процессов аутофагии в этих нейронах.

Заключение. Таким образом, пренатальная алкоголизация сопровождается прогрессирующим нарушением органеллогенеза в нейронах фронтальной коры мозга крыс, развитием структурных и гистохимических дефектов, выявляемых на светооптическом уровне и лежащих в основе известных нарушений функционирования мозга у таких животных.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект М15М-057).

Acknowledgement. The research was supported by the BRFFI (M15M-057 project).

Списокиспользованных источников

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 вследствии антенатальной алкогольной интоксикации / Н. И. Артюхина, Л. В. Ноздрачева. – М., 1988. – 9 с. Деп. в ВИНИТИ 8.88, № 8475.

4. Попова, Э. Н. Ультраструктура мозга, алкоголь и потомство / Э. Н. Попова. – М.: Научный мир, 2010.

5. 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.

6. Бонь, Е. И. Инволюция нейронов коры головного мозга крыс, потреблявших алкоголь во время беременности / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Вес. Нац акад. навук Беларусі. – 2016. – № 1. – С. 59–64.

7. Каркищенко, Н. Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010.

8. Paxinos, G. The Rat Brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – Australia: Academic Press, 1986.

References

1. Riley E. P., Infante M. A., Warren K. R. “Fetal alcohol spectrum disorders: an overview”, *Neuropsychology Review*, 2011, no. 21, pp. 73–78.

2. Zimatkin S. M., Bon E. I. *Alkogol'nyi sindrom ploda* [Alcohol syndrome of fetus], New knowledge, Moscow, RU, 2014.

3. Artyukhina N. I., Nozdracheva L. V. *Narushenie strukturno-funktsional'noi organizatsii mitokhondrii kory golovnogo mozga belykh krys vsledstvii alkogolnoi intoksikatsii* [Disorder of the structure-function organization of mitochondria of the white rat brain due to antenatal alcohol intoxication], Moscow, RU, 1988.

4. Popova E. N. *Ultrastruktura mozga, alkogol' i potomstvo* [Brain ultrastructure, alcohol and posterity], Science World, Moscow, RU, 2010.

5. Bon' E. I., Zimatkin S. M. “Dynamics of histological changes in the pariental cortex of rats subjected to alcohol”, *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of Biomedical Sciences], 2015, no. 2, pp. 146–151.

6. Bon' E. I., Zimatkin S. M. “Involution of the cortex neurons of the rats taking alcohol during pregnancy”, *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Series of Medical Sciences], 2016, no. 1, pp. 59–64.

7. Karkishchenko N. N., Grachev S. V. *Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh* [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical studies], Profile 2C, Moscow, RU, 2010.

8. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinate*, Academic Press, Australia, 1986.

Информация об авторах

Зиматкин Сергей Михайлович – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: zimatkin@grsmu.by

Бонь Елизавета Игоревна – аспирант. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: kudyan@tut.by

Information about the authors

Zimatkin SergeyMichaylovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: zimatkin@grsmu.by

Bon Elizabeth Igorevna – Postgraduate student. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: kudyan@tut.by

Дляцитирования

Бонь, Е. И. Особенности органеллогенеза в нейронах коры мозга крыс после пренатальной алкоголизации / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 123–128.

For citation

Bon E. I., Zimatkin S. M. “Organellogenesis features in neurons of the cerebral cortex of rats after prenatal alcoholization”. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 1, pp. 123–128.