

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2017. №4

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2017. №4

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.

Главный редактор:

Александр Васильевич Сукало –
Президиум Национальной академии наук Беларуси, (Минск, Беларусь)

Редакционная коллегия:

И. В. Залуцкий (*заместитель главного редактора*) – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Н. С. Сердюченко (*заместитель главного редактора*) – Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

В. Г. Колосовская (*ведущий редактор журнала*)

О. В. Алейникова – Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Ф. И. Висмонт – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

М. А. Герасименко – Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

С. Л. Кабак – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Н. П. Митьковская – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

А. Г. Мрочек – Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Беларусь

Д. Л. Пиневиц – Первый заместитель министра здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Беларусь

О. О. Руммо – 9-я городская клиническая больница г. Минска, Минск, Беларусь

А. Ф. Смянович – Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Беларусь

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

Редакционный совет:

Э. Алекнавичус – Национальный институт рака, Вильнюс, Литва
Марк М. Ван Гулле – Университет Лёвен, Лёвен, Бельгия
Джурич Драган – Институт медицинской физиологии Ричарда Бьюриана Университета Белграда, Белград, Сербия
Т. П. Ключник – Российская академия медицинских наук, Москва, Россия
В. А. Кульчицкий – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
М.-А. Кусто – Анжерский университет, Анже, Франция
А. И. Мартынов – Медицинский центр Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия
Л. И. Надольник – Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь
Р. Г. Оганов – Российское кардиологическое общество, Москва, Россия
Н. Д. Савенкова – Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия
М. В. Угрюмов – Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия
И. А. Чешик – Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь

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

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

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия медицинских наук. 2017. №4

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *А. В. Новик*

Подписано в печать 16.11.2017. Выход в свет 28.11.2017. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 46 экз. Заказ 227.
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»,
Вестці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук, 2017

PROCEEDINGS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICAL SERIES. 2017. no. 4

The Journal was founded in 2004

Issued four times a year

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

Editor-in-Chief:

Aleksandr V. Sukalo – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Editorial Board:

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

Editorial Council:

- Eduardas Aleknavicius** – National Cancer Institute, Vilnius, Lithuania
- Igor A. Cheshik** – Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences, Gomel, Belarus
- Mark-Antoine Custaud** – University of Angers, Angers, France
- Dragan Djuric** – Richard Buryan Medical Physiology Institute of the University of Belgrade, Belgrade, Serbia
- Mark M. Van Hulle** – University of Leuven, Leuven, Belgium

Tatiana P. Klyushnik – Scientific Center of Mental Health of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia
Vladimir A. Kulchitsky – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences, Minsk, Belarus
Anatoly I. Martynov – Medical Center of the Administration of the President of the Russian Federation, Moscow, Russia
Liliya I. Nadolnik – Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus
Raphael G. Oganov – Russian Cardiology Society, Moscow, Russia
Nadezhda D. Savenkova – Saint-Petersburg State Pediatric Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia
Mikhail V. Ugryumov – Koltzov Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

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)

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

PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.
Medical series. 2017. no. 4

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *A. V. Novik*

It is sent of the press 16.11.2017. Appearance 28.11.2017. Format 60×84 ¹/₈. Offset paper. The press digital.
Printed pages 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 46 copies. Order 227.
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 August 2, 2013. License for the press No. 02330/455 dated December 30, 2013. Address: 40, F. Scorina Str., Minsk, 220141, Republic of Belarus.

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

ЗМЕСТ**КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА**

Антоневіч Н. Г., Гончаров А. Е., Бушчак О. В., Рында Е. Г., Чекан В. Л., Стринкевіч Э. А. Подавление цитотоксической функции CD8 ⁺ Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток мезенхимальными стволовыми клетками обонятельной выстилки полости носа	7
Митюкова Т. А., Мороз И. Н., Леонова Т. А., Безлер Ж. А., Кохан С. Б. Прогноз наджелудочковой тахикардии у пациентов, получающих супрессивную терапию L-тироксинном	17
Маслов А. П., Королько А. С., Соловей А. Н. Анализ ревизионных операций после эндопротезирования тазобедренного сустава	24
Белоновская Е. Б., Нарута Е. Е., Лукивская О. Я., Казючиц О. А., Буко В. У. Влияние комбинации урсодезоксихолевой кислоты и пентоксифиллина на течение экспериментального фиброза печени	31
Ткачев С. В., Фомина Е. Г., Григорьева Е. Е., Счесленок Е. П., Семижон П. А., Школина Т. В., Маханько О. В., Владыко А. С. Синтез рекомбинантного C _H 2-C _H 3 участка Fc-фрагмента IgG1 человека и его использование для получения мышинных поликлональных антител	41
Романова И. В., Гончаров А. Е., Дударева Н. И. Оптимизация условий проведения теста активации базофилов	48
Смирнова Е. С., Григоренко Е. А., Митьковская Н. П. Стрессовая гипергликемия у пациентов с острым крупноочаговым инфарктом миокарда	60
Янковская Л. В., Снежицкий В. А., Ляликов С. А., Степура Т. Л. Липидный профиль у пациентов с ишемической болезнью сердца в зависимости от полиморфизмов <i>BsmI</i> и <i>FokI</i> гена <i>VDR</i> и содержания витамина D	70
Астроўскі А. А., Гурыновіч В. А., Максімчык Ю. З., Астроўская А. Б., Арэхаў С. Д., Майсяёнак А. Г. Змяненне гісталагічнай структуры надныркавых залоз пацукоў пад уздзеяннем прэднязалона і яго камбінацыі з вітамінам D	77
Митьковская Н. П., Петрова Е. Б. Абдоминальное ожирение в формировании хронической сердечной недостаточности после перенесенного крупноочагового инфаркта миокарда	86
Корж Н. А., Леонтьева Ф. С., Делевская В. Ю., Хилько М. С. Роль общих и специфических иммунологических изменений в прогрессировании коксартроза	93

АГЛЯДЫ

Можейко Л. А. Особенности циркуляции ферментов поджелудочной железы	102
Вязова Л. И., Башлакова А. Н. Антенатальные миокардиты у детей	111
Марацкая Н. В., Деялтовская М. Г., Бучель Ю. Ю., Улезко Е. А. Методы нейровизуализации в диагностике патологических изменений головного мозга у детей	120

CONTENTS

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

Antonevich N. H., Hancharou A. Y., Buschik O. V., Rynda A. G., Chekan V. L., Strinkevich E. A. Suppression of CD8 ⁺ T-lymphocytes and natural killer cells cytotoxic function by human olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells	7
Mityukova T. A., Moroz I. N., Leonova T. A., Bezler J. A., Kohan S. B. Prediction of supraventricular tachycardia in patients underwent L-thyroxine suppressive therapy	17
Maslov A. P., Korolko A. S., Solovei A. N. Analysis of revision operations after hip joint replacement	24
Belonovskaya E. B., Naruta E. E., Lukivskaya O. Y., Kazyuchits O. A., Buko V. U. Influence of the combination of ursodeoxycholic acid and pentoxifylline on experimental liver fibrosis	31
Tkachov S. V., Fomina E. G., Grigorieva E. E., Scheslenok E. P., Semizhon P. A., Shkolina T. V., Mahanko O. V., Vladyko A. S. Synthesis of recombinant polypeptide including C _H 2-C _H 3 domains of the human IgG1 Fc-fragment and its use for mouse polyclonal antibody production	41
Ramanava I. U., Hancharou A. Y., Dudarava N. I. Optimization of basophil activation test conditions	48
Smirnova E. S., Grigorenko E. A., Mitkovskaya N. P. Stress-induced hyperglycemia in patients with acute myocardial infarction	60
Yankouskaya L., Snezhitskiy V., Lyalikov S., Stepuro T. Lipid profile in patients with ischemic heart disease depending on <i>BsmI</i> and <i>FokI</i> polymorphisms of the <i>VDR</i> gene and the vitamin D content	70
Astrowski A. A., Gurynovich V. A., Maksimchyk Yu. Z., Astrowskaya A. B., Arekhau S. D., Moiseenok A. G. Changes in the histological structure of rat adrenal glands exposed to prednisolone and its combination with vitamin D	77
Mitkovskaya N. P., Petrova E. B. Abdominal obesity in the development of chronic heart failure after myocardial infarction	86
Korzh M. O., Leontieva F. S., Dielievskaya V. Yu., Khilko M. S. Role of general and specific immunological changes in the progression of coxarthrosis	93

SURVEYS

Mozheiko L. A. Features of circulation of pancreatic enzymes	102
Viazova L. I., Bashlakova A. N. Antenatal myocarditis of children	111
Maratskaya N. V., Devyaltovskaya M. G., Buchel Yu. Yu., Ulezko E. A. Methods of neuroisization in diagnosis of pathological changes in the children's brain	120

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА**CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE**

УДК 576.54:57.085.23

Поступила в редакцию 16.08.2017

Received 16.08.2017

Н. Г. Антоневи́ч¹, А. Е. Гонча́ров¹, О. В. Буши́к¹, Е. Г. Рында¹, В. Л. Чека́н², Э. А. Стринкеви́ч²

¹Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь

²Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования,
Минск, Республика Беларусь

**ПОДАВЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ CD8⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ
И ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ
КЛЕТКАМИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ПОЛОСТИ НОСА**

Аннотация. В работе изучены иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки (МСК ОВ) полости носа человека в отношении функциональной активности цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и естественных киллерных клеток (ЕКК) – клеточно-опосредованной цитотоксичности. Впервые показано, что иммуномодулирующий эффект МСК ОВ на ЦТЛ и ЕКК проявляется в подавлении механизмов реализации цитотоксической функции (снижении продукции перфорина и гранзима В, уменьшении экспрессии CD107a), что снижает способность эффекторных клеток уничтожать клетки-мишени. Полученные данные могут быть использованы при разработке биомедицинских клеточных продуктов на основе МСК ОВ для лечения заболеваний, в иммунопатогенезе которых ведущая роль принадлежит цитотоксической активности ЦТЛ и ЕКК.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, обонятельная выстилка, цитотоксичность, Т-лимфоциты, естественные киллерные клетки

Для цитирования: Подавление цитотоксической функции CD8⁺ Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток мезенхимальными стволовыми клетками обонятельной выстилки полости носа / Н. Г. Антоневи́ч [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 7–16.

N. H. Antonevich¹, A. Y. Hancharou¹, O. V. Buschik¹, A. G. Rynda¹, V. L. Chekan², E. A. Strinkevich²

¹Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

**SUPPRESSION OF CD8⁺ T-LYMPHOCYTES AND NATURAL KILLER CELLS CYTOTOXIC FUNCTION
BY HUMAN OLFATORY MUCOSA-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS**

Abstract. In this study, the immunomodulatory effects of human olfactory mucosa-derived stem cells (hOM-MSCs) against the cell-mediated cytotoxic activity of cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) and natural killer cells (NKC) are evaluated. It has been shown that the immunomodulatory activity is realized through a suppression of cytotoxic mechanisms (decrease in the expression of perforin, granzyme B, CD107a), which eventually leads to a reduced ability to induce apoptosis in target tumor cells. The obtained results can be applied for development of biomedical cell products based on hOM-MSCs to treat diseases in which the leading role is played by the cytotoxic activity of CTL and NKCs.

Keywords: mesenchymal stem cells, olfactory mucosa, cytotoxicity, T-lymphocytes, natural killer cells

For citation: Antonevich N. H., Hancharou A. Y., Buschik O. V., Rynda A. G., Chekan V. L., Strinkevich E. A. Suppression of CD8⁺ T-lymphocytes and natural killer cells cytotoxic function by human olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 7–16. (in Russian).

Введение. В настоящее время биомедицинские клеточные продукты (БМКП) на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК) активно используются в качестве альтернативных и/или дополнительных лечебных средств в профилактике и терапии ряда тяжелых заболеваний, имеющих в основе иммунологические нарушения.

МСК, полученные из различных тканевых источников, характеризуются рядом общих функциональных свойств, которые обуславливают терапевтический эффект при их трансплантации. МСК проявляют иммуномодулирующую активность в отношении различных звеньев клеточного и гуморального иммунитета; продуцируют широкий спектр факторов роста, цитокинов, белков внеклеточного матрикса, посредством чего оказывают трофический, проапоптотический, ангиостимулирующий и другие локальные эффекты. Несмотря на то что МСК разного тканевого происхождения в целом схожи между собой, спектр их иммуотропного и паракринного эффектов, а также степень выраженности последних различаются [1].

Перспективными БМКП являются МСК, выделенные из соединительнотканной подложки обонятельной выстилки (ОВ) средних и верхних носовых ходов [2]. Получение БМКП на основе МСК привлекает своей атравматичностью, хорошей переносимостью при заборе биоматериала, а также простотой и дешевизной выделения и культивирования клеток. К настоящему времени методы накопления биомассы МСК ОВ [3] оптимизированы, а клетки используются для проведения клинических испытаний метода лечения хронических стенозов трахеи и гортани (NCT03130374 в международной базе данных о проводимых клинических исследованиях и их результатах – <https://clinicaltrials.gov>). В перспективе планируется оценка эффективности МСК ОВ в лечении аутоиммунных заболеваний. Полученные нами ранее результаты изучения влияния МСК ОВ на иммунофенотип и функциональные свойства Т-клеток и антигенпредставляющих клеток показали, что МСК ОВ оказывают иммуносупрессивный эффект на пролиферацию Т-лимфоцитов [4], индуцируют дифференцировку дендритных клеток в толерогенном направлении [5], стимулируют формирование у макрофагов противовоспалительного иммунофенотипа [6]. Также известно, что МСК ОВ оказывают иммуносупрессивный эффект на пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, естественных киллерных клеток (ЕКК) [7], подавляют дифференцировку Т-регуляторных лимфоцитов (Трег) [8, 9], функцию эозинофилов [10]. В то же время отсутствуют данные о влиянии МСК ОВ на функциональную активность цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и ЕКК.

Известно, что МСК из других источников способны оказывать модулирующий эффект на ЦТЛ и ЕКК. Изучение влияния МСК из костного мозга, жировой ткани (ЖТ) и пупочного канатика показало, что все три типа МСК подавляют активацию $CD8^+$ Т-лимфоцитов и ЕК-клеток, причем МСК ЖТ оказывают наиболее выраженный иммуносупрессивный эффект [1]. Под влиянием МСК у ЕКК снижалась экспрессия фактора некроза опухолей- α , других цитокинов, перфорина, подавлялась пролиферация и цитотоксическая функция [1, 11]. При клеточной терапии посттрансплантационных осложнений МСК могут оказывать благоприятный клинический эффект за счет генерации $CD8^+$ регуляторных клеток Трег [12]. В то же время есть риск, что МСК могут способствовать прогрессированию онкологических заболеваний за счет подавления функции цитотоксических клеток. При сокультивировании МСК, линии клеток рака молочной железы и мононуклеаров периферической крови (МПК) наблюдался протекторный эффект МСК в отношении опухолевых клеток. Под влиянием МСК происходило образование Трег, ингибирование пролиферации и продукции гранзима В у ЦТЛ [13]. Проводились исследования влияния МСК на Т-клеточный ответ при воздействии вирусных патогенов. Показано, что МСК оказывают слабое влияние на пролиферацию антиген-специфичных ЦТЛ, специфичных к вирусам Эпштейн–Барра и цитомегаловируса. ЦТЛ сохраняли способность к продукции интерферона- γ и цитотоксическую активность [14].

Цель данного исследования – оценить влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки полости носа человека на цитотоксическую функцию цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток общей фракции мононуклеаров периферической крови при их сокультивировании.

Объекты и методы исследования. Получение МСК ОВ. Образцы ткани ОВ среднего носового хода забирали у пациентов с диагнозом хронический стеноз трахеи и/или гортани (J38.6 и J95.5 по МКБ-10) с их информированного согласия (РНПЦ оториноларингологии). Культуры МСК ОВ ($n = 3$) получали методом эксплантов [2]. Соответствие клеток критериям МСК оценивали согласно общепринятым международным рекомендациям [15].

Выделение МПК осуществляли методом градиентного центрифугирования [4].

В качестве опухолевых клеток-мишеней использовали суспензионную перевиваемую клеточную линию Jurkat (человек, Т-лимфобластный лейкоз) из Коллекции культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии [16, 17].

Условия сокультивирования МСК ОБ и МПК. При постановке эксперимента в различных комбинациях использовали три культуры МСК ОБ и МПК, выделенные из крови 6 доноров. За сутки до сокультивирования высевали культуры МСК ОБ в концентрации 20 тыс. клеток/см² в 2 мл ростовой среды на 12-луночные планшеты. На следующие сутки после образования монослоя МСК ОБ с конфлюентностью 70–80 % из лунки удаляли 1 мл ростовой среды и вносили туда 1 мл суспензии МПК (соотношение МСК и МПК 1 : 10). В качестве контроля использовали МПК без присутствия МСК. Каждый вариант выполняли в двух повторах. Культивирование клеток осуществляли в ростовой среде α -МЕМ с добавлением 10 %-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 50 мкг/мл гентамицина в CO₂-инкубаторе (37 °С, 5 % CO₂ и влажности воздуха 95 %) на протяжении 3 сут.

Постановка цитотоксических тестов. После сокультивирования МПК отмывали путем центрифугирования, суспендировали в свежей ростовой среде в концентрации 1 млн клеток/мл и вносили 1 мл суспензии в лунку 12-луночного планшета. Затем в каждую лунку добавляли 1 мл суспензии клеток-мишеней в концентрации 200 тыс/мл (соотношение МПК и Jurkat 5 : 1). В качестве контролей использовали отдельно клетки Jurkat и МПК. Клетки инкубировали в течение 2 ч, затем оценивали количество некротических и апоптотических клеток линии Jurkat, анализировали уровень экспрессии молекулы CD107a на поверхности ЦТЛ и ЕКК из общей фракции МПК. Для анализа внутриклеточного содержания перфорина и гранзима у ЦТЛ и ЕКК за 20 мин до добавления суспензии Jurkat в лунки с МПК вносили монензин в конечной концентрации 10 мкг/мл для ингибирования трансмембранного транспорта, добавляли клетки-мишени и инкубировали их в течение 2 ч. В качестве контролей использовали культуры МПК с добавлением монензина, но без добавления клеток линии Jurkat.

Определение поверхностных маркеров, жизнеспособности и апоптоза клеток. Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием антител к молекулам CD3, CD8, CD16, CD90, CD107a, перфорину, гранзиму В. Жизнеспособность оценивали с помощью зондов Annexin V и TO-PRO-3. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD Biosciences, США). Учитывали как содержание позитивных по исследуемому маркеру клеток (процент экспрессии), так и среднюю интенсивность флуоресценции, которая отражает число молекул (в усл. ед.) на клетку. Для анализа данных использовали программу Weasel версии 3.3 (WENI, Австралия).

Методы статистической обработки данных. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программ Statistica версии 12 и StatPlus 2007 Professional (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах. Для сравнения выборок использовали непараметрические методы: U-критерий Манна–Уитни и W-критерий Вилкоксона. В качестве критерия достоверности различий между показателями принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Влияние МСК на продукцию цитолитических белков Т-лимфоцитами и ЕК-клетками. Основным способом реализации цитотоксичности является гранзим-перфориновый механизм. После активации клетками-мишенями у эффекторных клеток осуществляются транспорт цитолитических гранул к клеточной мембране, а затем их дегрануляция. Секретируемый белок перфорин формирует поры в мембране клеток-мишеней, и основные цитолитические белки гранзимы (сериновые протеазы) через поры попадают в цитоплазму, индуцируют каспазный каскад и запускают механизм апоптоза [18]. Таким образом, первой задачей исследования стало изучение влияния МСК ОБ на экспрессию белков перфорина и гранзима В у ЦТЛ и ЕКК.

При анализе контрольных культур МКП в популяции ЦТЛ число гранзим-позитивных клеток составляло 19,9 (10,0–25,7) % при средней интенсивности экспрессии белка 202,5 (84,0–270,0) усл. ед. на клетку. Число ЦТЛ, продуцирующих перфорин, составило 5,9 (3,2–8,1), интенсивность экспрессии – 7,7 (6,7–8,5) усл. ед. на клетку. При анализе культур МПК, сокультивированных с МСК ОБ, экспрессия перфорина и гранзима В в популяции ЦТЛ и число позитивных клеток достоверно не изменились.

При анализе популяции ЕКК в контрольных культурах МПК выявлено более 90 % гранзим- и перфорин-позитивных клеток. МСК ОБ не оказывали достоверного влияния на количество ЕКК, продуцирующих перфорин и гранзим В.

В то же время установлено достоверное снижение накопления гранзима В и перфорина в цитоплазме ЕКК после сокультивирования с МСК ОБ. Интенсивность экспрессии гранзима В в контрольных культурах составила 667,5 (401,0–747,0) усл. ед. на клетку, а после сокультивирования с МСК ОБ – 340,0 (290,0–466,0) усл. ед. на клетку ($p = 0,03$). Также достоверно снизилась экспрессия перфорина: в контрольных культурах она составила 47,6 (42,3–58,0) усл. ед. на клетку, после сокультивирования с МСК – 31,6 (29,8–33,6) усл. ед. ($p = 0,03$) (рис. 1).

Известно, что перфорин и гранзимы экспрессируются ЕКК конститутивно, в то время как у ЦТЛ базальная продукция белка выражена слабее и индуцируется после контакта с клеткой-мишенью [18].

Экспрессия CD107a ЦТЛ и ЕКК при сокультивировании с МСК ОБ. Следующим этапом работы стало изучение влияния МСК ОБ на экспрессию в популяциях ЦТЛ и ЕКК молекулы CD107a – маркера активации/дегрануляции. Молекула CD107a (ассоциированный с лизосомами мембранный протеин 1 – LAMP-1) совместно с перфорином локализована в секреторных гранулах ЕКК и ЦТЛ. В результате дегрануляции во внешнюю среду выделяются цитотоксические белки, а мембранный белок лизосом CD107a остается на внешней стороне цитоплазматической мембраны [19]. Таким образом, по интенсивности поверхностной экспрессии CD107a и числу позитивных клеток можно судить о эффективности активации ЕКК и ЦТЛ.

Так, в контрольных культурах МПК выявлено 0,9 (0,8–1,0) % CD8⁺CD107a⁺ ЦТЛ, а среди ЕКК доля клеток CD8⁺CD107a⁺ составила 2,1 (1,8–2,5) %. Сокультивирование с МСК ОБ приводило к практически полному подавлению спонтанной дегрануляции у эффекторных клеток, доля CD107a⁺ у ЦТЛ и ЕКК составила 0,45 (0,40–0,60) и 0,50 (0,40–0,60) % соответственно ($p = 0,03$).

При контакте контрольных МПК с клетками-мишенями происходила стимуляция дегрануляции, достоверно увеличивалось количество CD107a⁺ ЦТЛ и ЕКК – до 3,55 (2,8–5,8) и 3,30 (3,00–3,50) % соответственно ($p = 0,03$).

После сокультивирования МСК ОБ и МПК у ЦТЛ и ЕКК при стимуляции клетками Jurkat сохранялась способность к дегрануляции, но была достоверно ниже, чем у эффекторных клеток, культивированных без МСК ОБ. В МСК ОБ-индуцированных культурах содержание CD107a⁺ ЦТЛ и ЕКК составило 1,85 (1,5–2,3) и 1,7 (1,40–1,80) % соответственно ($p = 0,03$). Результаты сравнения 4 групп клеток представлены на рис. 2.

Таким образом, установлено, что сокультивирование МПК с МСК ОБ приводит к подавлению спонтанной и стимулированной поверхностной экспрессии белка CD107a в популяциях ЦТЛ и ЕКК.

Влияние МСК на цитотоксическую активность эффекторных клеток фракции МПК в отношении клеток-мишеней. Один из первых методов оценки клеточно-опосредованной цитотоксичности – тест на высвобождение в культуральную среду изотопа ⁵¹[Cr] из клеток-мишеней, предварительно маркированных радиоактивным Na₂Cr₂O₄ [20]. Высвобождение хрома происходит после гибели клеток вследствие нарушения целостности мембраны. К недостаткам данного метода можно отнести спонтанное высвобождение изотопа, работу с потенциально опасными радиоактивными веществами, использование специализированного оборудования.

Кроме того, применяются разнообразные ELISA тест-системы по выявлению количества IFN- γ , лактатдегидрогеназы, гранзима В и других веществ в супернатанте, которые позволяют лишь косвенно оценить цитотоксичность [21–25]. Наиболее точными и информативными являются методы, основанные на непосредственном учете количества мертвых и живых клеток-мишеней после сокультивирования с CD8⁺ ЦТЛ и/или ЕКК.

В данном исследовании использован точный, относительно простой и быстрый в исполнении метод на основе проточной цитометрии, адаптированный для теста цитотоксичности [26–28]. В качестве клеток-мишеней выбрана перевиваемая линия Jurkat, полученная от пациента, страдавшего Т-лимфобластным лейкозом. Предыдущие исследования показали, что клетки Jurkat характеризуются высокой экспрессией молекулы CD90 [16, 17], в то же время эта молекула практически не экспрессируется клетками периферической крови. Таким образом, после сокультивиро-

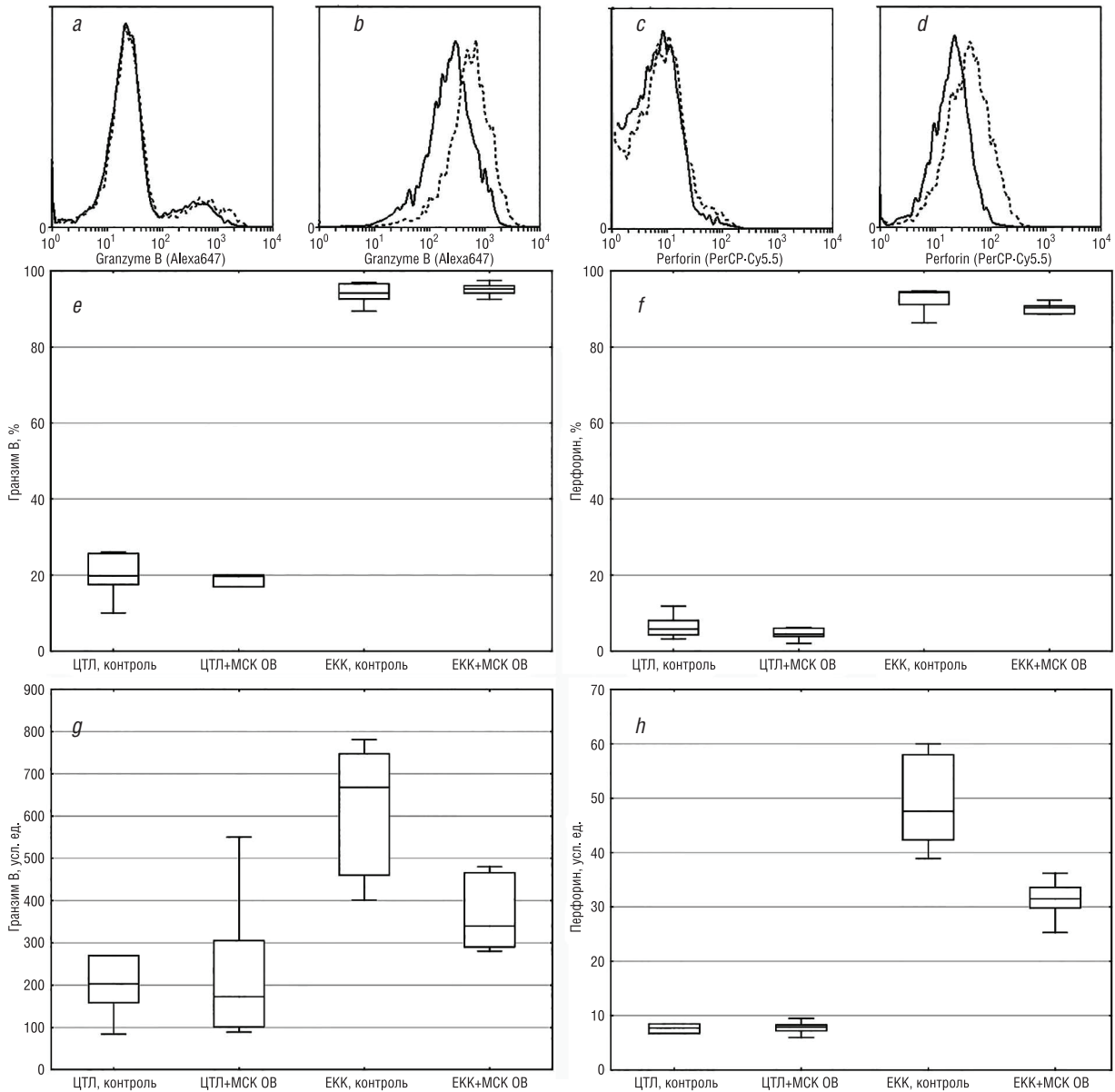


Рис. 1. Экспрессия перфорина и гранзима В в популяциях ЦТЛ и ЕКК при культивировании в присутствии и без МСК ОВ: гистограммы флуоресценции *a, c* – ЦТЛ; *b, d* – ЕКК, где непрерывной линией обозначена экспрессия под влиянием МСК ОВ и пунктирной – отрицательный контроль; *e* – содержание клеток, продуцирующих гранзим В; *f* – содержание клеток, продуцирующих перфорин; *g* – средняя интенсивность флуоресценции гранзима В; *h* – средняя интенсивность флуоресценции перфорина

Fig. 1. Expressions of perforin and granzyme B by cytotoxic T-lymphocytes and natural killer cells cultured alone and with olfactory mucosa derived mesenchymal stem cells: the histograms *a, c* – cytotoxic T-lymphocytes; *b, d* – natural killer cells, the continuous line indicates expression after culture with olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells; the dotted line indicates negative control; *e* – content of granzyme B⁺ cells; *f* – perforin⁺ cells; *g* – mean fluorescence intensity of granzyme B; *h* – mean fluorescence intensity of perforin

вания с МПК клетки Jurkat удобно гейтировать как CD90⁺-клетки и анализировать содержание апоптотических и некротических клеток по стандартной методике с применением зондов и ин-теркалирующих красителей. Использование CD90⁺ Jurkat позволяет избежать предварительного окрашивания клеток-мишеней витальными красителями (например, CFSE) для последующей идентификации в смешанной культуре с эффекторными клетками, как это принято при работе с другими опухолевыми линиями [27, 28].

Анализ полученных результатов показал, что в контрольных культурах Jurkat доля некротических клеток составила 2,3 (1,7–2,9) %, апоптотических – 4,0 (3,8–4,7) %. После инкубирования

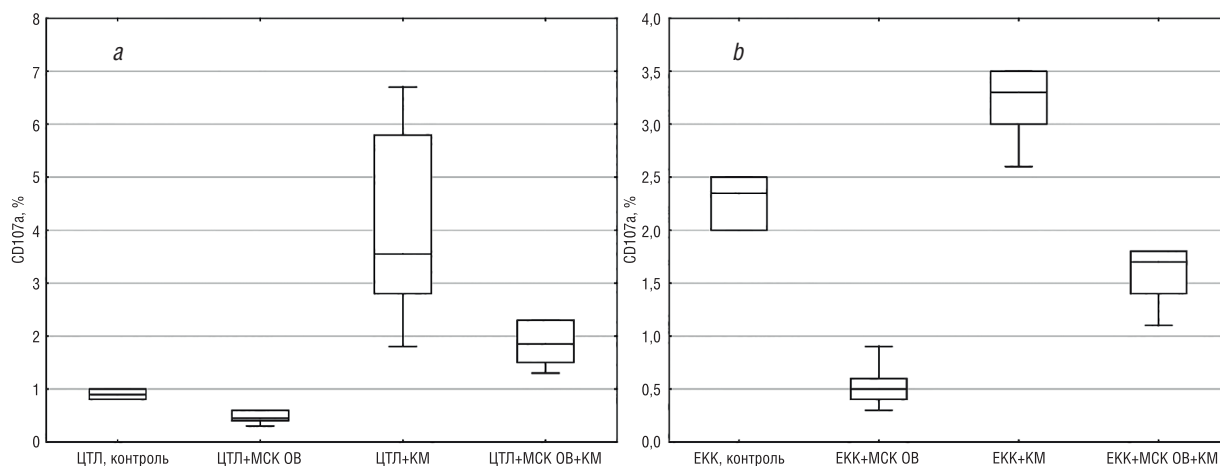


Рис. 2. Поверхностная экспрессия маркера дегрануляции CD107a ЦТЛ (a) и ЕКК (b) в различных условиях культивирования (KM – клетки-мишени Jurkat)

Fig. 2. Surface expression of CD107a degranulation marker by cytotoxic T-lymphocytes (a) and natural killer cells (b) cultured alone and with olfactory mucosa derived mesenchymal stem cells (TC – Jurkat target-cells)

клеток-мишеней с контрольными МПК содержание мертвых клеток достоверно возросло, но оставалось в пределах 2,85 (2,8–3,0) % ($p = 0,027$), в то же время доля клеток, вступивших в апоптоз, составила 22,2 (18,2–27,3) %. Таким образом, в смешанной культуре МПК и Jurkat в течение 2 ч происходит индукция начальных этапов клеточно-опосредованной цитотоксичности клеток-мишеней (рис. 3).

Для изучения влияния МСК ОВ на функциональную активность эффекторных клеток проводили сокультивирование МПК и МСК ОВ на протяжении 3 сут и анализировали способность МПК вызывать цитотоксичность. В результате анализа жизнеспособности клеток Jurkat установлено, что МСК ОВ-индуцированные МПК также оказывают цитотоксический эффект на опухолевые клетки: некроз составил 3,0 (2,4–3,9) %, апоптоз – 13,3 (12,0–15,4) %. В то же время при сравнении функциональной активности контрольных и МСК ОВ-стимулированных МПК установлено, что уровень апоптоза клеток Jurkat при контакте с МСК ОВ-стимулированными МПК был достоверно ниже ($p = 0,03$), а количество некротических опухолевых клеток в культурах достоверно не различалось (рис. 3).

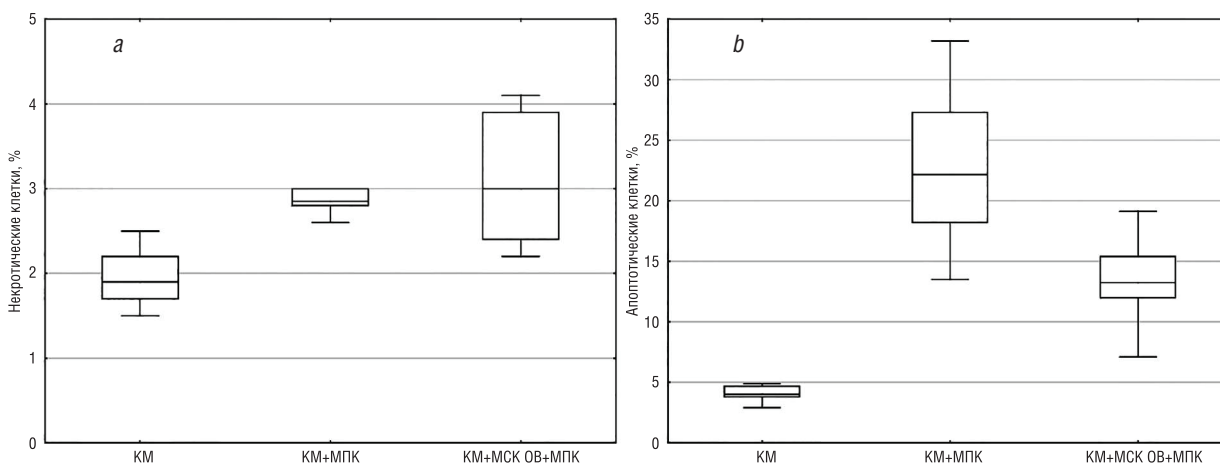


Рис. 3. Цитотоксическая активность клеток общей фракции МПК, культивированных в различных условиях, в отношении клеток-мишеней (KM) (a – содержание некротических KM линии Jurkat; b – содержание апоптотических KM линии Jurkat)

Fig. 3. Cytotoxic activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultured in different conditions in relation to the Jurkat target cells (a – content of necrotic Jurkat cells; b – content of apoptotic Jurkat cells)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что МСК ОВ-стимулированные эффектор-ные клетки общей фракции МПК характеризуются сниженной способностью вызывать апоптоз клеток-мишеней линии Jurkat.

Заключение. В работе впервые изучены иммуномодулирующие свойства МСК ОВ в отношении специфической функциональной активности ЦТЛ и ЕК-клеток – клеточно-опосредованной цитотоксичности. Дана оценка разным аспектам проявления ЦТЛ и ЕКК цитотоксических свойств: накоплению белков, задействованных в механизмах киллинга, и индукции апоптоза/некроза опухолевых клеток-мишеней (конечный эффект).

Показано, что под влиянием МСК ОВ у ЕК-клеток снижается продукция цитотоксических эффекторных молекул: гранзима В – в 2 раза, перфорина – в 1,5 раза. В то же время МСК ОВ не оказывают выраженного влияния на экспрессию перфорина и гранзима В ЦТЛ.

Установлено, что МСК ОВ при сокультивировании практически полностью подавляют у ЦТЛ и ЕК-клеток спонтанную дегрануляцию, оцениваемую по экспрессии маркера CD107a. После сокультивирования с МСК ОВ уровень индуцированной дегрануляции (клетки-мишени Jurkat) у ЦТЛ и ЕК-клеток также достоверно ниже, чем в контрольных культурах.

Выявлена сниженная способность МСК ОВ-индуцированных МПК вызывать апоптоз у опухолевых клеток-мишеней линии Jurkat.

Таким образом, иммуномодулирующий эффект МСК ОВ в отношении ЦТЛ и ЕКК в общей фракции МПК проявляется в подавлении механизмов реализации цитотоксической функции, что приводит к снижению способности эффекторных клеток уничтожать клетки-мишени.

Полученные данные могут быть использованы при разработке БМКП на основе МСК ОВ для лечения заболеваний, в иммунопатогенезе которых ведущая роль принадлежит цитотоксической активности ЦТЛ и ЕКК, например, для предотвращения отторжения трансплантата. В то же время, на наш взгляд, описанные свойства следует учитывать при применении МСК ОВ у пациентов, страдающих онкозаболеваниями и хроническими инфекциями.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells / A. Ribeiro [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2013. – Vol. 4, N 5. – P. 125.
2. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties / V. Delorme [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2010. – Vol. 19, N 6. – P. 853–866.
3. Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки носовой полости человека / Н.Г. Антонец [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2015. – № 1. – С. 42–49.
4. Антонец, Н.Г. Иммуносупрессивные свойства культивируемых эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия человека / Н.Г. Антонец, А.Е. Гончаров, В.Л. Чекан // *Здравоохранение.* – 2014. – № 10. – С. 14–19.
5. Гончаров, А.Е. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки на антигенный профиль дендритных клеток / А.Е. Гончаров, Н.Г. Антонец, В.Л. Чекан // *Новости мед.-биол. наук.* – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 102–106.
6. Антонец, Н.Г. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки человека на дифференцировку макрофагов *ex vivo* / Н.Г. Антонец, А.Е. Гончаров // *Современные проблемы инфекционной патологии человека* : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии ; под ред. Л.П. Титова. – Электрон. текстовые дан. – Минск, 2016. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM). – Вып. 9. – С. 185–190.
7. Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues / M. Di Trapani [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22, N 22. – P. 2990–3002.
8. Olfactory ecto-mesenchymal stem cells possess immunoregulatory function and suppress autoimmune arthritis / K. Rui [et al.] // *Cell Mol. Immunol.* – 2016. – Vol. 13, N 3. – P. 401–408.
9. IL-17 down-regulates the immunosuppressive capacity of olfactory ecto-mesenchymal stem cells in murine collagen-induced arthritis / J. Tian [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, N 28. – P. 42953–42962.
10. Nasal mucosa derived-mesenchymal stem cells from mice reduce inflammation via modulating immune responses / C. Yang [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, N 3. – P. e0118849.
11. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells / P.A. Sotiropoulou [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24, N 1. – P. 74–85.
12. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction / C. Prevosto [et al.] // *Haematologica.* – 2007. – Vol. 92, N 7. – P. 881–888.
13. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta / S.A. Patel [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184, N 10. – P. 5885–5894.

14. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses / H. Karlsson [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 112, N 3. – P. 532–541.
15. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement / M. Dominici [et al.] // *Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8, N 4. – P. 315–317.
16. Коллекция культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии: нынешнее состояние и перспективы развития / С. В. Корень [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека* : сб. науч. ст. – Минск, 2015. – Вып. 8. – С. 162–168.
17. Hancharou, A. Y. Comparative profile of surface and intracellular molecule expression in 10 immortalized human T cell lines to be considered for immunomodulatory drug evaluations / A. Y. Hancharou, E. V. Duzh, L. M. DuBuske // *Allergy*. – 2016. – Vol. 71, suppl. 102. – P. 187.
18. Janeway, C. T-cell mediated immunity / C. Janeway // *Janeway's Immunobiology* / K. Murphy, P. Travers, M. Walport. – New York, 2017. – Ch. 9. – P. 345–395.
19. Alter, G. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity / G. Alter, G. M. Malenfant, M. Altfeld // *J. Immunol. Methods*. – 2004. – Vol. 294, N 1/2. – P. 15–22.
20. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs / K. T. Brunner [et al.] // *Immunology*. – 1968. – Vol. 14, N 2. – P. 181–196.
21. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN γ -ELISpot assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial / C. Scheibenbogen [et al.] // *J. Immunol. Methods*. – 2000. – Vol. 224, N 1/2. – P. 81–89.
22. Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISpot assay / A. Schmittel [et al.] // *J. Immunother.* – 2000. – Vol. 23, N 3. – P. 289–295.
23. Correlation of human CD56⁺ cell cytotoxicity and IFN- γ production / E. G. Derby [et al.] // *Cytokine*. – 2001. – Vol. 13, N 2. – P. 85–90.
24. Granzyme B ELISPOT assay for ex vivo measurements of T cell immunity / F. H. Rininsland [et al.] // *J. Immunol. Methods*. – 2000. – Vol. 240, N 1/2. – P. 143–155.
25. Application of the granzyme B ELISPOT assay for monitoring cancer vaccine trials / K. Shafer-Weaver [et al.] // *J. Immunother.* – 2006. – Vol. 29, N 3. – P. 328–335.
26. Maecker, H. T. Multiparameter flow cytometry monitoring of T cell responses / H. T. Maecker // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 485. – P. 375–391.
27. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity / L. Zaritskaya [et al.] // *Expert Rev. Vaccines*. – 2010. – Vol. 9, N 6. – P. 601–616.
28. Noto, A. Cell-based flow cytometry assay to measure cytotoxic activity / A. Noto, P. Nqauv, L. Trautmann // *J. Vis. Exp.* – 2013. – N 82. – P. e51105.

References

1. Ribeiro A., Laranjeira P., Mendes S., Velada I., Leite C., Andrade P., Santos F., Henriques A., Grãos M., Cardoso C. M., Martinho A., Pais M., da Silva C. L., Cabral J., Trindade H., Paiva A. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 2013, vol. 4, no. 5, pp. 125. DOI: 10.1186/scrt336
2. Delorme B., Nivet E., Gaillard J., Häupl T., Ringe J., Deveze A., Magnan J., Sohler J., Khrestchatskiy M., Roman F. S., Charbord P., Sensebe L., Layrolle P., Feron F. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells and Development*, 2010, vol. 19, no. 6, pp. 853–866. DOI: 10.1089/scd.2009.0267
3. Antonevich N. G., Goncharov A. E., Chekan V. L., Sidorenko I. V., Kvacheva Z. B. Immunophenotypic characteristics of human nasal olfactory mesenchymal stem cells. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2015, no. 1, pp. 42–49 (in Russian).
4. Antonevich N. G., Goncharov A. E., Chekan V. L. Immunosuppressive properties of cultured ectomesenchymal stem cells of human olfactory epithelium. *Zdravoohranenie [Healthcare]*, 2014, no. 10, pp. 14–19 (in Russian).
5. Goncharov A. E., Antonevich N. G., Chekan V. L. Effect of human nasal olfactory mesenchymal stem cells on the antigenic profile of dendritic cells. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk [News of Biomedical Sciences]*, 2015, vol. 10, no. 3, pp. 102–106 (in Russian).
6. Antonevich N. G., Goncharov A. E. Effect of mesenchymal stem cells of the olfactory lining of the human on the differentiation of macrophages *ex vivo*. *Sovremennye problemy infekcionnoj patologii cheloveka [Modern problems of human infectious pathology]*, Ministry of Health of the Republic of Belarus, the Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, in Titov L. P. (ed.), electronic text dan, 1 electronic optical disk (DVD-ROM). Minsk, 2016, iss. 9, pp. 185–190 (in Russian).
7. Di Trapani M., Bassi G., Ricciardi M., Fontana E., Bifari F., Pacelli L., Giacomello L., Pozzobon M., Féron F., De Coppi P., Anversa P., Fumagalli G., Decimo I., Menard C., Tarte K., Krampera M. Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues. *Stem Cells and Development*, 2013, vol. 22, no. 22, pp. 2990–3002. DOI: 10.1089/scd.2013.0204
8. Rui K., Zhang Z., Tian J., Lin X., Wang X., Ma J., Tang X., Xu H., Lu L., Wang S. Olfactory ecto-mesenchymal stem cells possess immunoregulatory function and suppress autoimmune arthritis. *Cellular and Molecular Immunology*, 2016, vol. 13, no. 3, pp. 401–408. DOI: 10.1038/cmi.2015.82

9. Tian J., Rui K., Tang X., Wang W., Ma J., Tian X., Wang Y., Xu H., Lu L., Wang S. IL-17 down-regulates the immunosuppressive capacity of olfactory ecto-mesenchymal stem cells in murine collagen-induced arthritis. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, no. 28, pp. 42953–42962. DOI: 10.18632/oncotarget.10261
10. Yang C., Li J., Lin H., Zhao K., Zheng C. Nasal mucosa derived-mesenchymal stem cells from mice reduce inflammation via modulating immune responses. *PLoS One*, 2015, vol. 20, no. 11–12, p. e0118849. DOI: 10.1371/journal.pone.0118849
11. Sotiropoulou P. A., Perez S. A., Gritzapis A.D., Baxevas C. N., Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 2006, vol. 24, no. 1, pp. 74–85. DOI: 10.1634/stemcells.2004–0359
12. Prevosto C., Zancolli M., Canevali P., Zocchi M. R., Poggi A. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*, 2007, vol. 92, no. 7, pp. 881–888.
13. Patel S. A., Meyer J. R., Greco S. J., Corcoran K. E., Bryan M., Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *Journal of Immunology*, 2010, vol. 184, no. 10, pp. 5885–5894. DOI: 10.4049/jimmunol.0903143
14. Karlsson H., Samarasinghe S., Ball L. M., Sundberg B., Lankester A. C., Dazzi F., Uzunel M., Rao K., Veys P., Le Blanc K., Ringden O., Amrolia P.J. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 3, pp. 532–541. DOI: 10.1182/blood-2007–10–119370
15. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, vol. 8, no. 4, pp. 315–317.
16. Koren' S. V., Kabanova Ju. A., Antonevich N. G., Duzh E. V., Goncharov A. E., Gorbunov V. A., Shimanovich V.P. Collection of cultures of human and animal cells RRPC of epidemiology and microbiology: current state and prospects of development. *Sovremennye problemy infekcionnoj patologii* [Modern problems of human infectious pathology]. Minsk, 2015, iss. 8, pp. 162–168 (in Russian).
17. Hancharou A. Y., Duzh E. V., DuBuske L. M. Comparative profile of surface and intracellular molecule expression in 10 immortalized human T cell lines to be considered for immunomodulatory drug evaluations. *Allergy*, 2016, vol. 71, suppl. 102, p. 187.
18. Janeway C., Murphy K., Travers P., Walport M. *Janeway's Immunobiology*. New York, 2017, ch. 9, pp. 345–395.
19. Alter G., Malenfant J. M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*, 2004, vol. 294, no. 1/2, pp. 15–22. DOI: 10.1016/j.jim.2004.08.008
20. Brunner K. T., Mael J., Cerottini J.C., Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, 1968, vol. 14, no. 2, pp. 181–196.
21. Scheibenbogen C., Romero P., Rivoltini L., Herr W., Schmittel A., Cerottini J. C., Woelfel T., Eggermont A. M., Keilholz U. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN γ -ELISpot assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *Journal of Immunological Methods*, 2000, vol. 224, no. 1/2, pp. 81–89.
22. Schmittel A., Keilholz U., Thiel E., Scheibenbogen C. Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISpot assay. *Journal of Immunotherapy*, 2000, vol. 23, no. 3, pp. 289–295.
23. Derby E. G., Reddy V., Nelson E. L., Malyguine A. Correlation of human CD56⁺ cell cytotoxicity and IFN- γ production. *Cytokine*, 2001, vol. 13, no. 2, pp. 85–90. DOI: 10.1006/cyto.2000.0804
24. Rininsland F. H., Helms T., Asaad R. J., Boehm B. O., Tary-Lehmann M. Granzyme B ELISpot assay for ex vivo measurements of T cell immunity. *Journal of Immunological Methods*, 2000, vol. 240, no. 1/2, pp. 143–155.
25. Shafer-Weaver K., Rosenberg S., Strobl S., Gregory Alvord W., Baseler M., Malyguine A. Application of the granzyme B ELISPOT assay for monitoring cancer vaccine trials. *Journal of Immunotherapy*, 2006, vol. 29, no. 3, pp. 328–335. DOI: 10.1097/01.cji.0000203079.35612.c8
26. Maecker H. T. Multiparameter flow cytometry monitoring of T cell responses. *Methods in Molecular Biology*, 2009, vol. 485, no. 3, pp. 375–391. DOI: 10.1007/978–1-59745–170–3_25
27. Zaritskaya L., Shurin M. R., Sayers T. J., Malyguine A. M. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Review of Vaccines*, 2010, vol. 9, no. 6, pp. 601–616. DOI: 10.1586/erv.10.49
28. Noto A., Nquav P., Trautmann L. Cell-based flow cytometry assay to measure cytotoxic activity. *Journal of Visualized Experiments*, 2013, no. 82, p. e51105. DOI: 10.3791/51105

Информация об авторах

Антоневич Наталья Георгиевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: antonevich.n@gmail.com.

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com.

Information about the authors

Natalia H. Antonevich – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antonevich.n@gmail.com.

Andrei Y. Hancharou – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com.

Бущик Оксана Васильевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: oksanabuschik@gmail.com.

Рында Елена Геннадьевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alenarynda@gmail.com.

Чекан Валерий Леонидович – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. Сухая, 8, 220004, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lor3377@yandex.ru.

Стринкевич Эльвира Анатольевна – канд. мед. наук, ассистент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. Сухая, 8, 220004, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lorkafedra@tut.by.

Oksana V. Buschik – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oksanabuschik@gmail.com.

Alena G. Rynda – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alenarynda@gmail.com.

Valery L. Chekan – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (8, Sukhaya Str., 220004, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lor3377@yandex.ru.

Elvira A. Strinkevich – Ph. D. (Med.), Assistant. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (8, Sukhaya Str., 220004, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lorkafedra@tut.by.

Т. А. Митюкова¹, И. Н. Мороз², Т. А. Леонова³, Ж. А. Безлер², С. Б. Кохан¹

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

³Минский городской клинический онкодиспансер, Минск, Республика Беларусь

ПРОГНОЗ НАДЖЕЛУДОЧКОВОЙ ТАХИКАРДИИ У ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАЮЩИХ СУПРЕССИВНУЮ ТЕРАПИЮ L-ТИРОКСИНОМ

Аннотация. Известно, что лечение пациентов с тиреоидным раком включает проведение супрессивной терапии L-тироксина. Наиболее частыми осложнениями субклинического гипертиреоза, возникающего при лечении, являются нарушения сердечного ритма и, в частности, тахикардия.

Цель исследования – разработать прогностическую модель расчета развития наджелудочковой тахикардии у молодых пациентов (20–44 года), длительное время (более 5 лет) получающих супрессивную терапию L-тироксина.

Предложена логит-регрессионная модель, описывающая индивидуальный прогноз развития наджелудочковой тахикардии в зависимости от пола, показателей вариабельности сердечного ритма (CV, SI) и уровня свободного тироксина. Расчетное значение прогностического показателя Y позволяет выявлять пациентов, имеющих высокую вероятность развития заболевания, и проводить снижение дозы L-тироксина, учитывая целевые значения тиреотропного гормона. В работе проводится анализ контролируемых показателей у пациентов как с благоприятным, так и с неблагоприятным прогнозом развития заболевания.

Ключевые слова: супрессивная терапия L-тироксина, прогноз наджелудочковой тахикардии, вариабельность сердечного ритма, уровень свободного тироксина в крови

Для цитирования: Прогноз наджелудочковой тахикардии у пациентов, получающих супрессивную терапию L-тироксина / Т. А. Митюкова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 17–23.

T. A. Mityukova¹, I. N. Moroz², T. A. Leonova³, J. A. Bezler², S. B. Kohan¹

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

³Minsk City Clinical Oncological Dispensary, Minsk, Republic of Belarus

PREDICTION OF SUPRAVENTRICULAR TACHYCARDIA IN PATIENTS UNDERWENT L-THYROXINE SUPPRESSIVE THERAPY

Abstract. It is known that the treatment of patients with thyroid cancer includes a need for suppressive therapy with L-thyroxine. The most frequent complications of subclinical hyperthyroidism arising during treatment are cardiac arrhythmias and, in particular tachycardia.

The goal is to develop a prognostic model for calculating the development of supraventricular tachycardia in young patients (20–44 years) who were subjected to L-thyroxine suppressive therapy for a long time (more than 5 years).

A logit-regression model is proposed for description of an individual prognosis of development of supraventricular tachycardia depending on sex, heart rate variability (CV, SI) and a free thyroxine level. The estimated value of the prognostic indicator Y allows one to identify patients with a high probability of developing a disease and to reduce a dose of L-thyroxine, taking into account the target values of the thyroid-stimulating hormone. The work analyzes the monitored indicators related to a favorable or unfavorable prognosis of development of the disease.

Keywords: suppressive therapy with L-thyroxine, prognosis of supraventricular tachycardia, heart rate variability, free thyroxine level in blood

For citation: Mityukova T. A., Moroz I. N., Leonova T. A., Bezler J. A., Kohan S. B. Prediction of supraventricular tachycardia in patients underwent to L-thyroxine suppressive therapy. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 17–23 (in Russian).

Введение. Пациенты, прооперированные по поводу высококодифференцированного рака щитовидной железы (ВДРЩЖ), сохраняют риск возобновления опухолевого роста, поэтому должны принимать L-тироксин в течение 10 лет (до полной ремиссии) с целью подавления (супрессии) уровня тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ < 0,5 мЕ/л) в сыворотке крови и снижения риска прогрессии тиреоидного рака [1–4].

При адекватном лечении ВДРЦЖ вероятность развития рецидивов основного заболевания сводится к минимуму, при этом на первый план выходят побочные эффекты длительного воздействия супрессивных доз L-тироксина, к которым в первую очередь относятся нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы [3–5]. Даже при субклинических формах гипертиреоза (сниженный уровень ТТГ до субнормальных значений и нормальные уровни тиреоидных гормонов в сыворотке крови) с повышенной частотой выявляется тахикардия, предсердная экстрасистолия, гипертрофия миокарда левого желудочка, наблюдается снижение толерантности к физической нагрузке, а в пожилом возрасте – мерцательная аритмия [5, 6]. На заместительную терапию L-тироксином переходят только при наличии болезней системы кровообращения (БСК), угрожающих жизни пациента [4], при этом проблема выявления ранних симптомов формирующейся патологии остается актуальной.

При обследовании молодых пациентов (возраст 20–44 года) с ВДРЦЖ (радиоиндуцированный рак ЩЖ), получающих комплексное лечение более 3–5 лет, на ЭКГ были зарегистрированы отклонения, включая повышенную частоту синдрома ранней реполяризации желудочков, на ЭхоКГ – нарастание массы миокарда левого желудочка по отношению к таковой в группе контроля (как правило, не выходящее за пределы нормативных значений), а также изменения variability сердечно-сосудистого ритма и частоты сердечных сокращений по данным холтеровского мониторирования [7, 8].

На сегодняшний день молодые пациенты с ВДРЦЖ, безусловно, являются группой повышенного риска по развитию БСК, что требует привлечения простых, доступных и чувствительных методов для выявления донологических признаков формирующейся патологии. Одним из таковых является кардиоинтервалография – изучение variability сердечно-сосудистого ритма, что позволяет выявлять тонкие изменения регуляторных процессов в ответ на внешние воздействия, включая ятрогенные факторы [8–10]. Известно, что наиболее частыми осложнениями гипертиреоза являются тахикардия и другие виды аритмий (в частности, у молодых пациентов с ВДРЦЖ отмечается наджелудочковая тахикардия [3–6]). Однако до сих пор не разработаны методы индивидуального прогнозирования наиболее вероятных БСК.

Цель исследования – разработать прогностическую модель расчета развития наджелудочковой тахикардии у молодых пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы, получающих супрессивную терапию L-тироксином более 5 лет, и апробировать ее использование при мониторинге этой группы пациентов.

Материалы и методы исследования. Процедура обследования включала информированное согласие, осмотр врачом-эндокринологом, измерение частоты сердечных сокращений (ЧСС) и артериального давления (АД) (Microlife, Швейцария). Интервалы нормы: ЧСС – 60–80 уд/мин, АД – от 100/60 до 130/85 мм рт. ст. Лица с установленными БСК и другими видами сопутствующей патологии были исключены из дальнейшего обследования.

Целевая группа состояла из 93 человек (73 женщин, 20 мужчин), у которых сохранялся стабильный уровень супрессии ТТГ ($< 0,5$ мЕ/л) на протяжении 5 лет и более. Возрастной интервал – 20–44 года, средний возраст – $30,99 \pm 0,49$ года. Пациенты получали супрессивную терапию L-тироксином в средней дозе $2,66$ мкг/кг массы тела. Продолжительность комплексного лечения ВДРЦЖ – $15,9 \pm 0,76$ года.

С помощью прибора «Варикард» (ООО «Медицинские Компьютерные системы», Россия) проведена оценка variability сердечно-сосудистого ритма (BCP), основанная на анализе длительности R–R-интервалов ЭКГ за 5-минутный интервал времени с оценкой таких временных и спектральных показателей, как стандартное отклонение полного массива кардиоинтервалов, показатель суммарной мощности вегетативной регуляции (SDNN, мс), квадратный корень из суммы разностей последовательного ряда кардиоинтервалов, показатель активности парасимпатического отдела регуляции (RMSSD, мс), коэффициент вариации общего массива кардиоинтервалов (CV), стресс-индекс, показатель преобладания центральных механизмов регуляции над автономными (SI), мощность высокочастотной составляющей, показатель парасимпатической активности (HF, %), мощность низкочастотной составляющей, показатель симпатической активности (LF, %), показатель симпато-парасимпатического баланса (LF/HF), мощность очень медленных волн, показатель гормонально-метаболической активности (VLF, %), индекс централизации (IC) [9, 10].

В утреннее время натощак (до приема лекарственных препаратов) производили забор крови из вены для определения уровней гормонов тиреоидного статуса (ТТГ) и свободного тироксина (св. Т4), интервал нормы – 0,8–2,0 нг/дл, с использованием наборов фирмы DRG (США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica (v. 6.0), результаты оценивали с использованием непараметрических методов. Основные результаты представлены в виде медианы (Me), нижних и верхних процентилей ([25; 75]). Достоверность различий между группами определяли с помощью критерия Манна–Уитни. При сравнении долей использовали критерий хи-квадрат.

Проведен регрессионный анализ, основанный на модели бинарных откликов, который позволил построить логит-регрессионную модель, описывающую прогноз развития наджелудочковой тахикардии в зависимости от пола, показателей variability сердечного ритма (CV, SI) и уровня св. Т4 у пациентов.

Результаты и их обсуждение. Логистический регрессионный анализ полученных данных показал, что построенная логит-регрессионная модель вполне адекватна и статистически значима, так как итоговые потери, оцененные с помощью функции максимального правдоподобия, составляют 47,3, а уровень значимости Chi-square – 23,6, $p = 0,0000923$. Уравнение логит-регрессионной модели развития наджелудочковой тахикардии, описывающей прогноз заболевания в зависимости от пола, показателей variability сердечного ритма (CV, SI) и уровня св. Т4 у пациентов целевой группы, имеющих супрессированный уровень ТТГ (<0,5 мЕ/л), принимает следующий вид:

$$Y = \frac{\exp(9,14 - 1,64\text{Пол} - 0,05\text{CV} - 0,006\text{SI} - 1,89\text{св. Т4})}{1 + \exp(9,14 - 1,64\text{Пол} - 0,05\text{CV} - 0,006\text{SI} - 1,89\text{св. Т4})}$$

Подставив числовые значения переменных: пол (цифра «1» в уравнении – мужской пол, цифра «2» – женский); коэффициент вариации кардиоинтервалов (CV); стресс-индекс (SI, степень преобладания центральных механизмов над автономными); св. Т4 (нг/мл), получаем прогнозное значение Y. Величина Y в интервале [0,5–1,0] оценивается как благоприятный прогноз, а в интервале [0,0–0,5] – как неблагоприятный прогноз, свидетельствующий о высокой вероятности развития наджелудочковой тахикардии у пациента. В связи с тем что в модуле не предусмотрена возможность расчета для произвольного наблюдения по значениям предикторов, для определения прогноза развития наджелудочковой тахикардии у пациента использовали программу Microsoft Excel.

На рис. 1 представлен рабочий лист Microsoft Excel с программой для расчета показателя Y.

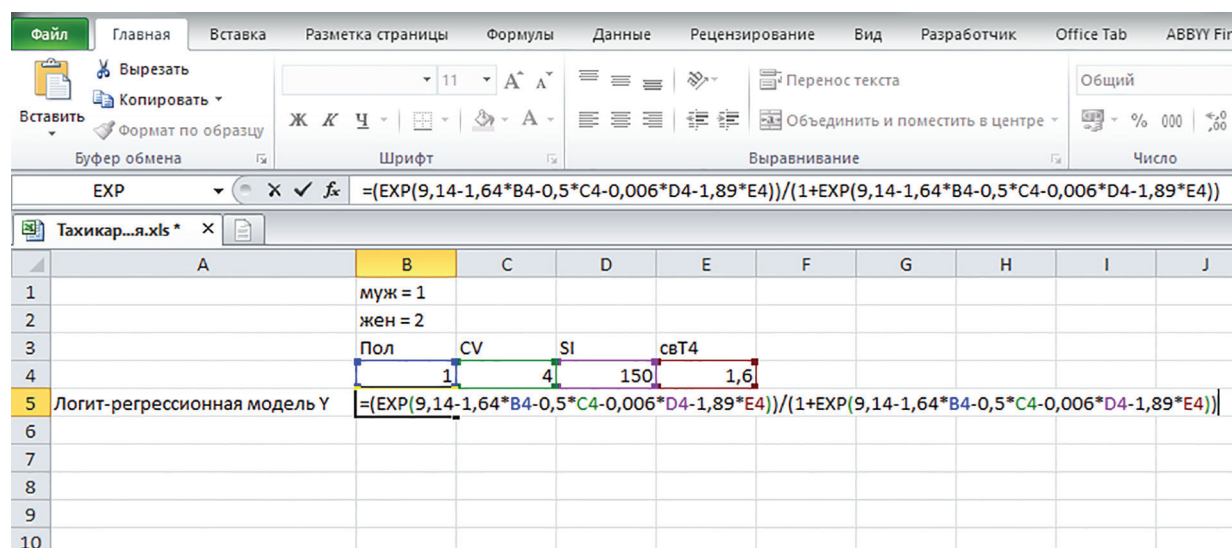


Рис. 1. Рабочий лист Microsoft Excel для расчета показателя Y

Fig. 1. Microsoft Excel worksheet for Y calculation

Использование формулы, приведенной на рис. 1, для расчета прогностического показателя позволяет выявлять пациентов с повышенным риском развития наджелудочковой тахикардии ($Y < 0,5$; рис. 2).

	A	B	C	D	E	F	G
1		муж = 1					
2		жен = 2					
3		Пол	CV	SI	свТ4	Результат	
4	Пациент 1	1	4	150	1,6	0,83	
5	Пациент 2	1	44,8	16	2,52	0,00	
6							

Рис. 2. Пример расчета прогностического значения Y для двух пациентов

Fig. 2. Example of calculation of a predicted value of Y for two patients

Выявленные у 38 пациентов прогностические значения $Y < 0,5$ свидетельствовали о высокой (74,2 %) вероятности развития наджелудочковой тахикардии.

Большинство пациентов подгруппы I ($n = 22$) с неблагоприятным прогнозом ($Y < 0,5$) имели повышенный уровень св. Т4, выходящий за пределы нормы. Это указывало на необходимость снижения дозы L-тироксина с целью нормализации уровня св. Т4. Однако снижение дозы L-тироксина необходимо проводить под контролем ТТГ, не допуская повышения его уровня за пределы целевых значений ($ТТГ < 0,5$ мЕ/л).

Лица подгруппы II ($n = 16$) с исходно неблагоприятным прогнозом ($Y < 0,5$) имели нормальный уровень св. Т4, но, несмотря на это, у них отмечались отклонения показателей ВСР (CV и SI) за пределы нормы. Последнее не находило однозначного объяснения. Поэтому представляло интерес оценить все контролируемые показатели в этих двух подгруппах и сравнить их с таковыми у пациентов подгруппы III с исходно благоприятным прогнозом ($Y > 0,5$).

Полученные данные представлены в таблице (в первой части – в виде медиан и 25–75 перцентилей, во второй – как отклонения изучаемых показателей от интервалов нормы).

В подгруппе I пациентов с неблагоприятным прогнозом ($Y < 0,5$) отмечалось достоверное повышение медианы уровня св. Т4 по сравнению с таковым у лиц подгрупп II и III. Доза L-тироксина превышала аналогичную величину в подгруппе с благоприятным прогнозом (III). Выявленные отличия указывали на явные проявления субклинического гипертиреоза у лиц подгруппы I. В подгруппе I удельный вес пациентов с $CV > N$ и сочетанием отклонений $CV > N$ и $SI < N$ составлял 31,8 % (7/22), что достоверно отличалось от показателей в подгруппе III, где данного отклонения и сочетания отклонений не установлено (0/18; хи-квадрат – 4,91; $p < 0,05$). Удельный вес пациентов с отклонением $SI > N$ составлял в I подгруппе 27 %, а в III – 56 %, однако достоверных различий не выявлено.

Поскольку снижение дозы L-тироксина проводилось под контролем ТТГ (не более 0,5 мЕ/л), важно было оценить исходные индивидуальные значения уровня гормона в данной подгруппе. Значения ТТГ у 59,1 % пациентов I подгруппы были менее 0,1 мЕ/л, у остальных не превышали 0,3 мЕ/л. Это позволило провести снижение дозы L-тироксина на 10–25 %, не выходя за границу целевого уровня гормона ($< 0,5$ мЕ/л), что привело к нормализации всех контролируемых показателей.

Контролируемые показатели у пациентов, получающих супрессивную терапию L-тироксинам (ТТГ < 0,5 мЕ/л), в зависимости от прогноза развития наджелудочковой тахикардии
Controlled indices in patients subjected to suppressive therapy with L-thyroxine (TSH < 0.5 mE / L) depending on the prognosis of supraventricular tachycardia

Показатель	Подгруппа пациентов		
	I. Неблагоприятный прогноз (n = 22)	II. Неблагоприятный прогноз (n = 16)	III. Благоприятный прогноз (n = 18)
Св. Т4, нг/дл	2,25 [2,15–2,39]	1,65 [1,59–1,69]*	1,64 [1,56–1,71]*
CV	5,75 [4,50–18,80]	5,55 [4,60–19,45]	4,60 [3,80–5,70]
SI	71,0 [26,0–157,0]	62,0 [22,0–162,5]	156,0 [68,0–236,0]
ТТГ, мЕ/л	0,05 [0,015–0,015]	0,10 [0,085–0,074]	0,08 [0,055–0,22]
Доза L-Т4, мкг/кг	2,39 [2,16–2,78]	2,29 [1,92–2,71]	1,95 [1,90–2,00]*
Критерий Манна–Уитни		Св. Т4: I–II U = 0,0000, p = 0,000000	Св. Т4: I–III U = 0,0000, p = 0,000000; Доза L–Т4: I–III U = 94,0, p = 0,004693
<i>Удельный вес пациентов с отклонениями контролируемых показателей</i>			
CV > N	7/22 (31,8 %)	5/16 (31,3 %)	0/18 (0 %)**
SI < N	8/22 (36,4)	5/16 (31,3 %)	2/18 (11,1 %)
Сочетание: CV > N, SI < N	7/22 (31,8 %)	5/16 (31,3 %)	0/18 (0 %)**
SI > N	6/22 (27,3 %)	4/16 (25,0 %)	10/18 (55,6 %)
ТТГ < 0,1 мЕ/л	13/22 (59,1 %)	13/16 (81,3 %)	10/18 (55,6 %)
Сочетание: ТТГ < 0,1 мЕ/л, CV > N, SI < N	2/22 (9,1 %)	4/16 (25,0 %)	0/18 (0 %)
Критерий хи-квадрат			CV > N: I–III – 4,91, II–III – 4,34; p < 0,05; Сочетание: CV > N, SI < N: I–III – 4,91, II–III – 4,34; p < 0,05

П р и м е ч а н и е. Достоверные отличия (p < 0,05): * – от группы I, ** – от группы II.

Во II подгруппу пациентов с неблагоприятным прогнозом (Y < 0,5) вошли лица с нормальным уровнем св. Т4. Исходя из данных литературы, проявления субклинического гипертиреоза могут встречаться даже при нормальном уровне свободных фракций тиреоидных гормонов, если значение ТТГ составляет менее 0,4 мЕ/л. У 81,3 % лиц этой подгруппы значения ТТГ были менее 0,1 мЕ/л, т. е. регистрировался субклинический гипертиреоз. Изменения вариабельности сердечного ритма были идентичны таковым в подгруппе I. Удельный вес пациентов с характерным сочетанием отклонений (CV > N и SI < N) составлял 31,3 %, а с SI > N – 25 %. По-видимому, у лиц этой подгруппы отмечалась повышенная чувствительность к стандартным супрессивным дозам L-тироксина. Снижение дозы L-тироксина на 10–25 % под контролем уровня ТТГ (в пределах 0,5 мЕ/л) привело к нормализации показателей вариабельности сердечного ритма и нормализации Y.

Пациенты с благоприятным прогнозом (Y > 0,5) подгруппы III получали достоверно более низкие дозы L-тироксина, чем пациенты подгруппы I. Все значения св. Т4 находились в пределах нормы. Однако средний уровень ТТГ был сопоставим с таковым в подгруппах I и II, при этом у 55,6 % лиц значения ТТГ были ниже 0,1 мЕ/л, что также было сопоставимо с показателями в подгруппах I и II. Главной отличительной особенностью показателей у этих пациентов было отсутствие отклонений CV за пределы нормы, тогда как у показателя SI проявлялась тенденция к повышению его значений. Сниженные значения SI не регистрировались, а повышенные отмечались у 55,6 % лиц. По-видимому, у пациентов этой подгруппы отмечалась индивидуальная устойчивость параметров сердечного ритма даже в условиях субклинического гипертиреоза, а возрастание роли центрального контура регуляции (SI > N) сдерживало размах вариабельности сердечного ритма. Лица этой подгруппы не нуждались в коррекции дозы L-тироксина.

Следует отметить один интересный случай, когда на фоне повышенного св. Т4 (2,4 нг/дл) и глубокой супрессии ТТГ (0,03 мЕ/л) было выявлено значение $Y > 0,5$, т. е. пациент имел благоприятный прогноз на фоне гипертиреоза. У этого пациента показатели ВСР были в норме (CV – 5,3, SI – 89). Очевидно, этот пример тоже отражает индивидуальную чувствительность, в данном случае – высокую устойчивость организма к влиянию супрессивных доз L-тироксина.

Оценивая характерные для неблагоприятного прогноза ($Y < 0,5$) сдвиги показателей ВСР – повышение CV на фоне снижения SI, следует отметить, что нарастание вариабельности сердечного ритма в ответ на субклинический гипертиреоз, по-видимому, является вариантом срыва адаптации в условиях избыточного поступления L-тироксина в организм. При этом снижение роли центрального контура регуляции ($SI < N$) увеличивает вероятность развития тахикардии и других нарушений сердечного ритма.

Выводы

1. При проведении медицинского осмотра молодых пациентов с ВДРЦЖ, получающих супрессивную терапию L-тироксином более 5 лет и имеющих супрессированный уровень ТТГ ($< 0,5$ мЕ/л), рекомендуется оценить прогноз развития наджелудочковой тахикардии по формуле

$$Y = \frac{\exp(9,14 - 1,64\text{Пол} - 0,05\text{CV} - 0,006\text{SI} - 1,89\text{св. Т4})}{1 + \exp(9,14 - 1,64\text{Пол} - 0,05\text{CV} - 0,006\text{SI} - 1,89\text{св. Т4})}$$

2. Значение Y в интервале $[0,5-1,0]$ оценивается как норма, а в интервале $[0,0-0,5]$ – как высокая вероятность развития наджелудочковой тахикардии. Во втором случае рекомендуется проводить снижение дозы L-тироксина (в рамках целевых значений ТТГ).

3. Снижение ежедневной дозы L-тироксина на 10–25 % под контролем уровней св. Т4 и ТТГ приводит к нормализации контролируемых показателей (св. Т4, CV, SI, включая величину Y) и тем самым предупреждает развитие наджелудочковой тахикардии у большинства пациентов. При отсутствии положительного результата необходима консультация врача-кардиолога.

4. У пациентов, у которых отмечается устойчивость к воздействию супрафизиологических доз L-тироксина, установлены нормальный уровень показателя CV и нормальное либо повышенное значение показателя SI на фоне супрессированных значений ТТГ (менее 0,5 мЕ/л).

5. Для пациентов с повышенной чувствительностью к стандартным супрессивным дозам L-тироксина характерны сдвиги вариабельности сердечного ритма ($CV > N$ и $SI < N$), что является основой для развития наджелудочковой тахикардии.

6. Проведение медицинского осмотра с определением вышеперечисленных показателей и расчетом прогноза наджелудочковой тахикардии (Y) позволяет предупредить развитие наиболее частого побочного эффекта супрессивной терапии, а также выявить пациентов, которым необходима консультация врача-кардиолога.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Revised management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer / D.S. Cooper [et al.] // *Thyroid*. – 2009. – Vol. 19, N 11. – P. 1167–1214.
2. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium / F. Pacini [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2006. – Vol. 54, N 6. – P. 787–803.
3. Румянцев, П. О. Современные принципы терапии L-тироксином после операции у больных высокодифференцированным раком щитовидной железы / П. О. Румянцев, С. В. Корнев, У. В. Румянцева // *Опухоли головы и шеи*. – 2013. – № 2. – С. 5–8.
4. Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований / под ред. О. Г. Суконко, С. А. Красно-го. – Минск : Проф. изд., 2012. – С. 440–451.
5. Biondi, B. Benefits of thyrotropin suppression versus the risks of adverse effects in differentiated thyroid cancer / B. Biondi, D. S. Cooper // *Thyroid*. – 2010. – Vol. 20, N 2. – P. 135–145.
6. Бокерия, О. Л. Фибрилляция предсердий при субклинической форме гипертиреоза (патогенез, клиника, лечение, прогноз) / О. Л. Бокерия, И. В. Волковская // *Анналы аритмологии*. – 2013. – Т. 10, № 4. – С. 201–209.
7. Влияние тироксина на сердечно-сосудистую систему и рецепцию трийодтиронина у пациентов с карциномой щитовидной железы / Т. А. Митюкова [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук*. – 2010. – № 1. – С. 92–98.

8. Мрочек, А. Г. Избранные аспекты состояния сердечно-сосудистой системы на фоне субклинического гипертиреоза / А. Г. Мрочек, С. Н. Артишевский // Мед. панорама. – 2003. – №2. – С. 7–9.
9. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем / Р. М. Баевский [и др.] // Вестн. аритмологии. – 2001. – №24. – С. 65–87.
10. Фролов, А. В. Контроль механизмов адаптации сердечной деятельности в клинике и спорте. – Минск : Полипринт, 2011. – 216 с.

References

1. Cooper D. S., Doherty G. M., Haugen B. R., Kloos R. T., Lee S. L., Mandel S. J., Mazzaferri E. L., Melver B., Pacini F., Schlumberger M., Sherman S. I., Steward D. L., Tuttle R. M. Revised management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 2009, vol. 19, no. 11, pp. 1167–1214.
2. Pacini F., Schlumberger M., Dralle H., Elisei R., Smit J. W. A., Wiersinga W. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *European Journal of Endocrinology*, 2006, vol. 54, no. 6, pp. 787–803. DOI: 10.1530/eje.1.02158
3. Rumiantsev P. O., Korenev S. V., Rumiantseva U. V. The modern principles of therapy the levotiroksiny ambassador of operation at patients with the high-differentiated cancer of a thyroid gland. *Opukholi golovy i shei* [Head and Neck Tumors], 2013, no. 2, pp. 5–8 (in Russian).
4. *Algorithms of diagnostics and treatment of malignant new growths*, in Sukonko O. G., Krasny S. A. (ed.). Minsk, Professional'nye izdaniya Publ., 2012, pp. 440–451 (in Russian).
5. Biondi B., Cooper D. S. Benefits of thyrotropin suppression versus the risks of adverse effects in differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 2010, vol. 20, no. 2, pp. 135–145. DOI: 10.1089/thy.2009.0311
6. Bokeriia O. L., Volkovskaia I. V. Fibrillation of auricles at a subclinical form of a gipertireoz (pathogenesis, clinic, treatment, forecast). *Annaly aritmologii* [Annals of Arrhythmology], 2013, vol. 10, no. 4, pp. 201–209 (in Russian).
7. Mitiukova T. A., Drozd V. M., Leonova T. A., Platonova T. Iu., Bezler Zh. A., Tuzova A. A., Lushchik M. L. Influence of a thyroksine on cardiovascular system and reception of a triyodothironine at patients with a carcinoma of a thyroid gland. *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medicine series*, 2010, no. 1, pp. 92–98 (in Russian).
8. Mrochek A. G., Artishevskii S. N. The chosen aspects of a condition of cardiovascular system against the background of a subclinical gipertireoz. *Meditinskaja panorama* [Medical Panorama], 2003, no. 2, pp. 7–9 (in Russian).
9. Baevskii R. M., Ivanov G. I., Chireikin L. V., Gavrilushkin A. P., Dovgalevskii P. Ia., Kukushkin Iu. A., Mironova T. F., Prilutskii D. A., Semenonov Iu. N., Fedorov V. F., Fleishman A. N., Medvedev M. M. The analysis of variability of heart rhythm when using various electrocardiographic systems. *Vestnik aritmologii* [Messenger of Aritmology], 2001, no. 24, pp. 65–87 (in Russian).
10. Frolov A. V. *Control of mechanisms of adaptation of heart activity in clinic and sport*. Minsk, Poliprint Publ., 2011. 216 p. (in Russian).

Информация об авторах

Митюкова Татьяна Алексеевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mityukovat@gmail.com.

Мороз Ирина Николаевна – д-р мед. наук, доцент, декан. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь).

Леонова Татьяна Авинировна – канд. мед. наук, заведующий отделением. Минский городской клинический онкологический диспансер (ул. Академическая, 2, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: avinir@mail.ru.

Безлер Жанна Анатольевна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bezler@tut.by.

Кохан Светлана Болеславовна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Skohan@yandex.ru.

Information about the authors

Tatyana A. Mityukova – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mityukovat@gmail.com.

Irina N. Moroz – D. Sc. (Med.), Assistant Professor, Dean. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus).

Tatyana A. Leonova – Ph. D. (Med.), Head of the Department. Minsk City Clinical Oncologic Dispensary (2, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: avinir@mail.ru.

Zhanna A. Bezler – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bezler@tut.by.

Svetlana B. Kohan – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Skohan@yandex.ru.

А. П. Маслов, А. С. Королько, А. Н. Соловей

Минская областная клиническая больница, а. г. Лесной, Минский район, Республика Беларусь

АНАЛИЗ РЕВИЗИОННЫХ ОПЕРАЦИЙ ПОСЛЕ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА

Аннотация. На основании собственных данных и анализа литературных источников подробно изложены возможные осложнения, связанные с хирургической техникой, процессом остеоинтеграции и износа компонентов эндопротеза тазобедренного сустава оригинальной конструкции. Приведенные нами данные свидетельствуют о высокой медико-социальной и экономической эффективности разработанной модели эндопротеза. Выявлен ряд факторов риска осложнений эндопротезирования, которые необходимо учитывать при осуществлении превентивных мероприятий. Установлено, что основным направлением в улучшении отдаленных результатов эндопротезирования с использованием эндопротеза бесцементной фиксации SLPS является улучшение его трибологических свойств.

Ключевые слова: эндопротезирование, тазобедренный сустав, осложнения, ревизионные операции

Для цитирования: Маслов, А. П. Анализ ревизионных операций после эндопротезирования тазобедренного сустава / А. П. Маслов, А. С. Королько, А. Н. Соловей // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2017. – № 4. – С. 24–30.

A. P. Maslov, A. S. Korolko, A. N. Solovei

Minsk Regional Clinical Hospital, a/g Lesnoy, Minsk district, Republic of Belarus

ANALYSIS OF REVISION OPERATIONS AFTER HIP JOINT REPLACEMENT

Abstract. Based on our experience and the analysis of the available literature the article presents details of possible complications associated with surgical technique, the process of osteo-integration and wear of components of a hip joint endoprosthesis of original design. The data presented in the article show the high medico-social and economic effectiveness of the developed model of endoprosthesis. The risk factors of complications of hip replacement were identified, which must be taken into account in the implementation of preventive measures. It has been established that the main direction in improving the long-term results of hip replacement using an endoprosthesis of cementless fixation of SLPS is to improve its tribological properties.

Keywords: endoprosthesis, hip joint, complications, revision operations

For citation: Maslov A. P., Korolko A. S., Solovei A. N. Analysis of revision operations after hip joint replacement. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 24–30 (in Russian).

Введение. Проблема лечения дегенеративно-дистрофических заболеваний и травматических повреждений тазобедренного сустава, резко ограничивающих его функцию, является одной из актуальных в современной ортопедии и травматологии. Значительная частота коксартрозов различной этиологии придает этой проблеме не только медицинскую, но и социальную значимость [1, 2]. В мировой практике для радикального восстановления опорной и двигательной функций при различных заболеваниях и повреждениях тазобедренного сустава широко используется эндопротезирование, которое можно отнести к одному из самых выдающихся достижений медицины. Эндопротезирование является одним из самых распространенных в настоящее время хирургических вмешательств [1, 3, 4].

Многолетний опыт, накопленный мировым сообществом ортопедов, показывает, что после проведения этой операции возможен ряд осложнений, а с увеличением сроков наблюдения результаты эндопротезирования ухудшаются [5]. Это обусловлено прежде всего асептическим расшатыванием одного или обоих компонентов имплантированного сустава, что приводит к потере его стабильности.

Основным направлением улучшения свойств эндопротезов начиная с 1980-х годов является технологическая реализация концепции бесцементной фиксации, при которой достигается

остеоинтеграция имплантата, т. е. имплантат становится частью кости посредством ее прирастания к шероховатой в микроскопическом плане поверхности эндопротеза [6, 7]. Для улучшения остеоинтеграционных свойств эндопротезов разрабатываются материалы с новыми пористыми поверхностями, модернизируется конструкция имплантатов, ведутся работы по улучшению биосовместимости электрохимических свойств конструктивных элементов [8–11]. Одним из передовых направлений в развитии технологии создания пористых структур является разработка трабекулярных объемных металлических конструкций с улучшением их фиксационных характеристик за счет костного врастания, увеличения пористости, числа и размера соединяющихся пор, объема вросшей в них кости [12–15].

С 1996 г. в ортопедо-травматологических отделениях учреждений здравоохранения Республики Беларусь при эндопротезировании тазобедренного сустава широко применяется разработанный академиком А. В. Руцким эндопротез бесцементной фиксации, строение компонентов которого характеризуется наличием активных в остеоинтеграционном плане объемных пористых титановых структур (вставки в ножке эндопротеза и пластиковом вкладыше винтовой чашки, а также пористое покрытие поверхности пресс-фит чашки) [16, 17].

Цель исследования – изучить отдаленные результаты эндопротезирования тазобедренного сустава с применением эндопротезов усиленной бесцементной фиксации SLPS.

Материалы и методы исследования. Исследование основано на результатах обследования и лечения 493 пациентов, которым в период с 1996 по 2004 г. в травматологических отделениях учреждения здравоохранения «Минская областная клиническая больница» было выполнено 558 первичных тотальных эндопротезирований тазобедренного сустава с имплантацией эндопротезов усиленной бесцементной фиксации (ЗАО «Альтимед», Беларусь), из них этапное эндопротезирование на двух тазобедренных суставах было осуществлено 65 пациентам. В дальнейшем, с 2005 по 2011 г., 45 из 493 пациентов было выполнено тотальное эндопротезирование тазобедренного сустава (ТЭТС) на противоположном тазобедренном суставе с имплантацией указанного эндопротеза. Таким образом, всего было прооперировано 493 пациента, которым имплантировано 603 эндопротеза усиленной бесцементной фиксации.

В дальнейшем из изучаемой группы было исключено 9 (1,5 %) пациентов из-за нагноения послеоперационной раны. По не связанным с эндопротезированием причинам в послеоперационном периоде умер 21 человек (21 сустав). Эти лица также были исключены из исследования. Таким образом, в изучаемую группу были включены 463 пациента, которым имплантировано 573 эндопротеза тазобедренного сустава усиленной бесцементной фиксации, из них у 110 выполнено двустороннее эндопротезирование.

Из 573 наблюдений имплантации эндопротезов тазобедренного сустава отдаленные результаты оценены в 497 (86,7 %) случаях. Из них у 484 пациентов результаты лечения оценены рентгенологически и клинически с заполнением разработанной анкеты, а у 13 – только клинически с заполнением анкеты без рентгенологического обследования. В 76 случаях изучить результаты лечения не удалось из-за смены места жительства пациентов.

Анализ послеоперационных асептических осложнений у пациентов изучаемой группы продолжался до 2016 г. При этом фиксировали такие осложнения, как перипротезные переломы, переломы компонентов протеза, вывихи эндопротеза, гетеротопическая перипротезная оссификация. При выполнении пациентам изучаемой группы ревизионной операции указывали ее причину и вид выполняемого вмешательства.

При анализе выполненных 573 ТЭТС установлено, что чаще всего эндопротезирование осуществлялось из-за дегенеративно-дистрофического остеоартроза (325 случаев, или 56,7 %), реже – при диспластическом коксартрозе (98 наблюдений, или 17,1 %) и аваскулярном некрозе головки бедренной кости (71 случай, или 12,4 %). При ложном суставе шейки бедренной кости выполнено 35 (6,1 %) эндопротезирований, при ревматоидном артрите – 9 (3,3 %). Реже имплантацию эндопротеза осуществляли при медиальном переломе шейки бедренной кости (9 случаев, или 1,6 %), посттравматическом коксартрозе (6 наблюдений, или 1,1 %), при артрозо-артрите другой этиологии (8 случаев, или 1,4 %) и по 1 (0,2 %) пациенту было с костным анкилозом тазобедренного сустава и с переломом головки бедренной кости.

Возраст больных варьировался от 19 лет до 81 года (среднее значение возраста – $54,6 \pm 0,48$ года, медиана (Me) – 56,0 года).

Результаты и их обсуждение. Интраоперационные осложнения. Повреждение магистральных артерий отмечено в 2 (0,3 %) случаях из 573. Повреждение бедренной артерии диагностировано в 1 случае, наружной подвздошной артерии – в 1. В обоих случаях повреждения магистральных сосудов были выполнены их ревизия и восстановление целостности: шов стенки бедренной артерии и протезирование участка подвздошной артерии синтетическим протезом.

Неврологические осложнения выявлены в 10 (1,7 %) случаях из 573, в том числе повреждение бедренного нерва – в 4 (0,7 %), седалищного нерва – в 4 (0,7 %), бедренного и седалищного нервов – в 2 (0,3 %). В 1 случае произведена ревизия седалищного нерва, в результате которой нарушение целостности нервного ствола не установлено. В остальных случаях осуществлено консервативное лечение послеоперационной нейропатии.

Из 573 проведенных операций интраоперационные перипротезные переломы отмечены в 57 (9,9 %) случаях. Переломы проксимального конца бедренной кости (тип А по Masrietal, 2004) были выявлены в 39 (68,4 %) случаях из 57, из них переломы типов А₂ и А₃ – в 8 (14,0 %) и 31 (54,4 %) случае соответственно. В 15 (26,3 %) случаях из 57 отмечены переломы диафиза бедра (тип В), из них переломы типов В₂ и В₃ – в 13 (22,8 %) и 2 (3,5 %) случаях. Переломы вертлужной впадины отмечены в 3 (5,3 %) наблюдениях.

В большинстве случаев перипротезные переломы наблюдались у пациентов с избыточным весом. Только в 11 случаях из 57 индекс массы тела (ИМТ) был нормальным (19,3 %), в 19 (33,3 %) отмечался избыточный вес пациентов, в 19 (33,3 %) – ожирение I степени. В 7 (12,3 %) случаях из 57 выявлено выраженное ожирение и в 1 (1,8 %) – морбидное. Среднее значение ИМТ пациентов с перипротезными переломами составило $29,5 \pm 5,07$ кг/м² (Me = 29,41 кг/м², минимальное значение – 19,8 кг/м², максимальное – 48,25 кг/м²). При этом перипротезные переломы значительно чаще отмечались у пациентов с ожирением (27 (13,6 %) случаев из 198 при ИМТ > 30), чем без ожирения (30 (8 %) случаев из 375 при ИМТ < 30), $p = 0,0320$.

При гипертрофированном кортикальном слое проксимального отдела бедренной кости (тип А по Dogt и соавт., 1993) перипротезные переломы отмечались в 7,6 % случаев, при сохранном кортикальном слое (тип В) – в 8,0 %, а при истончении кортикального слоя (тип С) – в 24,3 %. Развитие данного осложнения значительно чаще отмечалось при истончении кортикального слоя, чем при гипертрофированном ($p = 0,0020$) или сохраненном кортикальном слое ($p < 0,0001$).

Основная задача при лечении интраоперационного перелома заключается в обеспечении анатомического его вправления, стабильной фиксации перелома и протеза в правильном положении. При достижении этих целей возможна ранняя мобилизация пациента с возвращением нормальной функции конечности.

Послеоперационные осложнения. Из 484 наблюдений, проанализированных в отдаленном периоде клинически и рентгенологически, перипротезные переломы в разные сроки после ТЭТС отмечены в 3 (0,6 %) случаях. Во всех наблюдениях был диагностирован перелом верхней трети бедренной кости с нарушением стабильности ножки протеза (перелом тип В₂), полученный при значительной травме (падение с высоты). Пациентам произведено ревизионное эндопротезирование с удалением нестабильного бедренного компонента и заменой его ревизионной модульной ножкой бесцементной фиксации LinkMP, перекрывающей плоскость перелома диафиза, и дополнительной фиксацией фрагментов кости серкляжными швами.

Переломы бедренного компонента эндопротеза являются нечастым, но тяжелым осложнением эндопротезирования тазобедренного сустава. Из 484 наблюдений, проанализированных в отдаленном периоде, данный вид осложнения отмечен в 2 (0,4 %) случаях.

В результате динамического наблюдения за 374 пациентами с выполненными у них 484 ТЭТС установлено, что в 9 (1,9 %) случаях в разные сроки после операции отмечались вывихи эндопротезов. Первый вывих в 6 случаях наблюдался в стационаре, в 3 случаях – в позднем периоде. Число вывихов варьировалось от 2 до 4. В 8 случаях первым этапом лечения вывихов эндопротеза было консервативное (закрытое) вправление с иммобилизацией гонитной гипсовой повязкой в течение 6 недель. В одном случае вывих произошел вследствие ранней нестабильности чашки протеза с ее миграцией и разворотом, что потребовало ревизионной операции с переустановкой тазового компонента. Из 8 случаев консервативного лечения вывихов в 2 из них из-за несвоевременной диагностики повторных вывихов пришлось прибегнуть к открытому вправлению вывихов.

Часто, в 4 (44,4 %) случаях из 9, эндопротезированию, осложненному вывихами, предшествовала другая операция на оперируемом суставе. Так, в 2 случаях выполнен артродез тазобедренного сустава, в 1 – остеосинтез шейки бедренной кости, в 1 – остеосинтез заднего края вертлужной впадины. При этом у пациентов с наличием в анамнезе предшествующего хирургического вмешательства на оперируемом тазобедренном суставе вывихи эндопротеза отмечались значительно чаще, чем у пациентов без ранее выполненного оперативного вмешательства ($p = 0,0108$).

Из 484 проведенных операций, результаты которых изучены клинически и рентгенологически в отдаленном послеоперационном периоде, гетеротопическая перипротезная оссификация разной степени выявлена в 156 (32,2 %) случаях. При этом костные островки в мягких тканях области тазобедренного сустава (I степень оссификации по Brookeretal, 1973) отмечены в 112 (23,1 %) случаях из 484, костные «шпоры» со свободным промежутком более 1 см (II степень оссификации) – в 32 (6,6 %), костные «шпоры» со свободным промежутком менее 1 см (III степень оссификации) – в 12 (2,5 %). Случаи, когда рентгенологические данные свидетельствуют о соединении костных «шпор» и формировании экстрасуставного анкилоза (IV степень оссификации), в нашем исследовании не установлены.

Развитие гетеротопической перипротезной оссификации значительно чаще отмечено у мужчин, чем у женщин. Так, из 192 операций, выполненных у мужчин, данный тип осложнения отмечен в 83 (43,3 %) случаях, а из 292 операций, выполненных у женщин, – в 73 (25,0 %), $p < 0,0001$.

В нашем исследовании при выявлении гетеротопической оссификации I–III степени специального лечения пациентам не проводилось. При оссификации III степени и наличии болей рекомендовались периодически прием нестероидных противовоспалительных препаратов, лечебная физкультура для профилактики прогрессирования контрактуры и поддержания мышечного тонуса. Ревизионных вмешательств из-за оссификации в нашем исследовании не производилось.

Анализ ревизионных операций. Из 573 оперированных суставов за период наблюдения (с момента операции до декабря 2016 г.) был удален и заменен один или несколько компонентов эндопротеза (ножка, чашка, полиэтиленовый вкладыш) по любым причинам в 138 (24,1 %) случаях. Еще в 2 случаях причиной ревизионных операций послужили повторяющиеся вывихи эндопротеза. Однако в процессе этих операций, заключавшихся в открытом вправлении вывиха, замену компонентов эндопротеза не осуществляли.

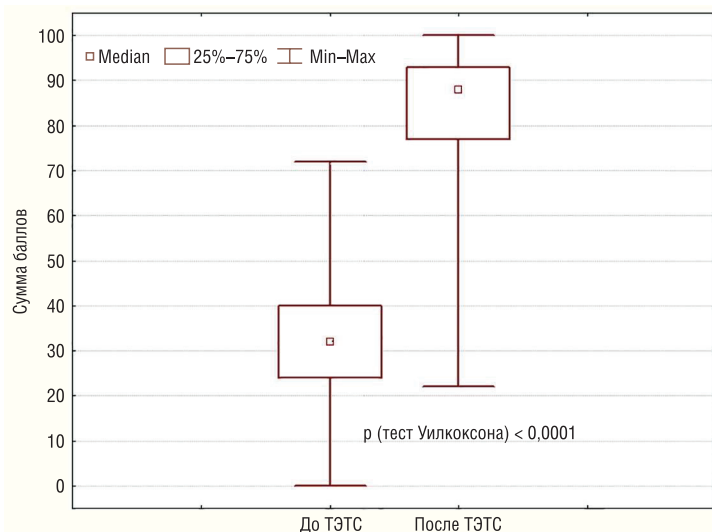
В 61 (44,2 %) случае из 138 причиной ревизионной операции была остеолитическая реакция с разрушением вкладыша, бедренной кости и/или вертлужной впадины. Из 61 ревизионной операции по причине остеолита в 36 (59 %) случаях был заменен только полиэтиленовый вкладыш, а компоненты протеза оставались стабильными, разрушение кости при этом не превышало 2/3 площади компонента. Ножку и чашку протеза оставляли на месте с выполнением эксскохлеации остеолитических очагов и тампонады их костной губчатой алломассой.

В 25 (41 %) случаях остеолитическое разрушение кости привело к нарушению стабильности компонентов эндопротеза, что вынудило осуществить их замену вместе с полиэтиленовым вкладышем.

В 18 (13,0 %) случаях из 138 причиной замены компонентов эндопротеза явилось не достигнутая первичная их фиксация. При этом наиболее часто (15 (83,3 %) случаев из 18) из-за несовершенства постановочного инструментария и снижения прочности костной ткани была заменена чашка протеза (последняя менялась вместе с полиэтиленовым вкладышем). В 3 случаях из-за остеопороза бедренной кости была нарушена первичная пресс-фиксация бедренного компонента в канале, что привело к развитию нестабильности уже на ранних сроках наблюдения.

В 53 (38,4 %) случаях из 138 причиной ревизионной операции явилась асептическая нестабильность компонентов эндопротеза. Из 53 ревизионных операций по этой причине в 33 (62,3 %) случаях была заменена чашка протеза (при замене чашки удаляли и полиэтиленовый вкладыш), в 15 (28,3 %) – бедренный компонент (при замене ножки из-за выявляемого умеренного износа полиэтиленового вкладыша последний профилактически был заменен в 9 случаях). В 5 случаях из-за тотальной нестабильности компонентов была выполнена замена всех компонентов эндопротеза (ножки, чашки, полиэтиленового вкладыша).

В 3 (4,2 %) случаях из 71 причиной замены компонентов эндопротеза в отдаленном периоде явился перипротезный перелом бедренной кости: в 2 случаях – травматический перипротезный перелом бедренной кости (осуществлена замена бедренного компонента), в 1 – перелом вертелов



Оценка функционального статуса пациентов до и после тотального эндопротезирования тазобедренного сустава, баллы

Assessment of the functional status of patients before and after total hip replacement, scores

достигнутая первичная фиксация компонентов ($1,76 \pm 0,03$ %) и переломы как бедренной кости, так и ножки эндопротеза ($0,69 \pm 0,02$ %). В этот период ревизионные операции из-за асептической нестабильности отмечались реже ($0,72 \pm 0,02$ %), а остеолитические изменения и критический износ полиэтиленового вкладыша ни в одном случае не являлись причиной повторного хирургического вмешательства.

В период от 5 до 10 лет наблюдения основной причиной замены компонентов эндопротеза становится асептическая нестабильность без значимых остеолитических изменений ($8,39 \pm 0,08$ %). Также в этот период возрастает значимость износа полиэтиленового вкладыша и связанного с ним остеолита как причин ревизионных операций ($5,03 \pm 0,07$ %). А в последующие годы наблюдения износ полиэтиленового вкладыша и остеолитиз становятся основными причинами замены компонентов эндопротеза ($18,93 \pm 0,18$ %), а число ревизионных операций вследствие остеолита увеличивается многократно.

Социальный эффект применения эндопротеза тазобедренного сустава усиленной бесцементной фиксации оценен на основе характеристик функциональной адаптации пациентов после эндопротезирования по балльной шкале Харриса.

Предоперационный клинический статус по шкале Харриса оценен в 573 наблюдениях (балльная оценка функционального статуса варьировалась от 0 до 59 баллов со средним значением $31,3 \pm 0,5$; Me = 32 балла). После ТЭТС функциональный статус за период наблюдения, оцененный в 484 случаях значительно улучшился (Me = 88): минимальное значение – 22 балла, максимальное – 100 баллов, $p < 0,0001$ (см. рисунок).

При этом из 484 оцененных в отдаленном периоде результатов эндопротезирования тазобедренного сустава с применением эндопротеза усиленной бесцементной фиксации отличный и хороший функциональный результат получен в 375 (77,5 %) случаях (отличный – в 227 (46,9 %), хороший – в 148 (30,6 %)), удовлетворительный – в 53 (10,9 %), неудовлетворительный – в 56 (11,6 %).

Выводы

1. Широкое клиническое применение разработанного эндопротеза тазобедренного сустава усиленной бесцементной фиксации демонстрирует высокую медико-социальную и экономическую эффективность. Эндопротезирование тазобедренного сустава с использованием предложенной модели эндопротеза позволяет значительно улучшить функциональный статус пациентов по шкале Харриса с 32 баллов до операции до 88 баллов после ТЭТС ($p < 0,0001$) и достичь положительных функциональных результатов в 88,4 % наблюдений.

из-за выраженного стресс-шилдинга проксимального отдела бедренной кости (осуществлена замена вкладыша чашки эндопротеза).

В 2 случаях был заменен бедренный компонент эндопротеза из-за его перелома.

При выборе имплантата, устанавливаемого взамен удаленному, акцентировали внимание на сохранности и опороспособности костной ткани в области имплантации.

В ходе исследования проанализированы причины ревизионных операций в разные периоды наблюдения после имплантации эндопротезов тазобедренного сустава усиленной бесцементной фиксации.

На протяжении первых 5 лет после имплантации основной причиной ревизионных операций была не-

2. К числу значимых послеоперационных осложнений в отдаленном периоде относятся вывихи эндопротезов (1,9 %). У пациентов с наличием в анамнезе предшествующего хирургического вмешательства на оперируемом тазобедренном суставе вывихи эндопротеза отмечались значительно чаще, чем у пациентов без ранее выполненного оперативного вмешательства ($p = 0,0108$).

3. В отдаленном послеоперационном периоде развитие гетеротопической перипротезной оссификации разной степени выявлено в 32,2 % случаев, причем значительно чаще она отмечалась у мужчин, чем у женщин ($p < 0,0001$).

4. В отдаленном периоде после ТЭТС износ полиэтиленового вкладыша и остеолит являются основными причинами замены компонентов эндопротеза, а число ревизионных операций вследствие остеолита увеличивается многократно. Данный факт определяет приоритетность улучшения трибологических свойств в повышении срока службы эндопротеза.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Корнилов, Н.В. Актуальные вопросы организации травматолого-ортопедической помощи населению / Н.В. Корнилов, К.И. Шапиро // Травматология и ортопедия России. – 2002. – №2. – С. 35–39.
2. Остеоартроз: современное состояние проблемы (аналитический обзор) / А.К. Орleckий [и др.] // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2001. – №2. – С. 96–99.
3. Клинико-анатомическое обоснование применения бедренных компонентов эндопротезов тазобедренного сустава / Н.В. Загородний [и др.] // Эндопротезирование в России. – Казань ; СПб., 2005. – Вып. I. – С. 28–39.
4. Callaghan, J. The Adult Hip. Lippincott / J. Callaghan, A. Rosenberg, H.E. Rubash. – 2-nd ed. – Philadelphia : Williams & Wilkins, 2006. – 1569 p.
5. Flecher, X. Management of severe bone loss in acetabular revision using a trabecular metal shell / X. Flecher, S. Sporer, W. Paprosky // J. Arthroplasty. – 2008. – Vol. 23, N 7. – P. 949–955.
6. Brånemark, P.I. Osseointegration and its experimental background / P.I. Brånemark // J. Prosthet. Dent. – 1983. – Vol. 50, N 3. – P. 399–410.
7. Clinical aspects of osseointegration in joint replacement. A histological study of titanium implants / L. Linder [et al.] // J. Bone Joint Surg. Br. – 1988. – Vol. 70, N 4. – P. 550–555.
8. Long-term follow-up of a hydroxyapatite ceramic-coated threaded cup: an analysis of survival and fixation at up to 15 years / A. Tindall [et al.] // J. Arthroplasty. – 2007. – Vol. 22, N 8. – P. 1079–1082.
9. Ten to fifteen-year follow-up after total hip arthroplasty with a tapered cobalt-chromium femoral component (tri-lock) inserted without cement / M.A. Teloken [et al.] // J. Bone Joint Surg. Am. – 2002. – Vol. 84-A, N 12. – P. 2140.
10. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants / Y.-T. Sul [et al.] // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26, N 33. – P. 6720–6730.
11. Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications / D.M. Brunette [et al.]. – Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2001. – 1019 p. – (Engineering materials).
12. Савич, В.В. Современные материалы хирургических имплантатов и инструментов / В.В. Савич, М.Г. Киселев, А.И. Воронович. – Изд. 2-е, доп. и перераб. – Минск : ДокторДизайн, 2004. – 102 с.
13. Clinical validation of a structural porous tantalum biomaterial for adult reconstruction / J.D. Bobyn [et al.] // J. Bone Joint Surg. Am. – 2004. – Vol. 86-A, suppl. 2. – P. 123–129.
14. Levine, B. A new era in porous metals: Applications in orthopaedics / B. Levine // MetFoam 2007: Porous metals and metallic forms : proceedings of the fifth International conference ... / ed. L.P. Lefebvre, J. Banhart, D.C. Dunand. – Lancaster, 2008. – P. 251–254.
15. Ryan, G.E. Porous titanium scaffolds fabricated using a rapid prototyping and powder metallurgy technique / G.E. Ryan, A.S. Pandit, D.P. Apatidis // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, N 27. – P. 3625–3635.
16. Маслов, А.П. Аспекты остеоинтеграции винтовой чашки эндопротеза тазобедренного сустава усиленной бесцементной фиксации / А.П. Маслов // Медицина. – 2013. – №3. – С. 10–16.
17. Рущкий, А.В. Бесцементное эндопротезирование тазобедренного сустава эндопротезом собственной конструкции / А.В. Рущкий, А.П. Маслов // Літопіс травматолoгiі та ортопедiі. – 2006. – №1/2. – С. 31–36.

References

1. Kornilov N. V., Shapiro K.I. The actual questions of trauma and orthopedic assistance to the population. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia], 2002, no. 2, pp. 35–39 (in Russian).
2. Orleckii A. K., Karpov I. N., Omel'ianenko N. P., Markov Iu. A., Mironov S. P. Osteoarthritis: current state of the problem (analytical review). *Vestnik travmatologii i ortopedii imeni H.H. Priorova* [Bulletin of Traumatology and Orthopedics named H.H. Priorov], 2001, no. 2, pp. 96–99 (in Russian).
3. Zagorodnii N. V., Elkin D. V., Makunin V. I., Banetskii M. V. Clinical and anatomical substantiation of the use of femoral components of hip joint endoprostheses. *Endoprotezirovanie v Rossii* [Endoprosthesis Replacement in Russia]. Kazan ; St. Petersburg, 2005, rel. 1, pp. 8–39 (in Russian).

4. Callaghan J., Rosenberg A., Rubash H. E. *The Adult Hip*. Lippincott, 2-nd ed. Philadelphia, Williams & Wilkins, 2006. 1569 p.
5. Flecher X., Sporer S., Paprosky W. Management of severe bone loss in acetabular revision using a trabecular metal shell. *Journal of Arthroplasty*, 2008, vol. 23, no. 7, pp. 949–955. DOI: 10.1016/j.arth.2007.08.019
6. Brånemark P.I. Osseointegration and its experimental background. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 1983, vol. 50, no. 3, pp. 399–410. DOI: 10.1016/S0022-3913(83)80101-2
7. Linder L., Carlsson A., Marsal L., Bjursten L. M., Brånemark P.I. Clinical aspects of osseointegration in joint replacement. A histological study of titanium implants. *Journal of Bone and Joint Surgery (Br.)*, 1988, vol. 70, no. 4, pp. 550–555.
8. Tindall A., James K. D., Slack R., James C., Shetty A. A. Long-term follow-up of a hydroxyapatite ceramic-coated threaded cup: an analysis of survival and fixation at up to 15 years. *Journal of Arthroplasty*, 2007, vol. 22, no. 8, pp. 1079–1082. DOI:10.1016/j.arth.2006.11.019
9. Teloken M. A., Bissett G., Hozack W. J., Sharkey P. F., Rothman R. H. Ten to fifteen-year follow-up after total hip arthroplasty with a tapered cobalt-chromium femoral component (tri-lock) inserted without cement. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am.)*, 2002, vol. 84-A, no. 12, p. 2140.
10. Sul Y. T., Johansson C., Byon E., Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 33, pp. 6720–6730. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.058
11. Brunette D. M., Tengvall P., Textor M., Thomsen P. *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*, series: Engineering materials. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 2001. 1019 p. DOI: 10.1007/978-3-642-56486-4
12. Savich V. V., Kiselev M. G., Voronovich A. I. *Modern materials of surgical implants and instruments*, 2nd ed., supplemented and revised. Minsk, DoktorDizain Publ., 2004. 104 p. (in Russian).
13. Boby J. D., Poggio R. A., Krygier J. J., Lewallen D. G., Hanssen A. D., Lewis R. J., Unger A. S., O’Keefe T. J., Christie M. J., Nasser S., Wood J. E., Stulberg S. D., Tanzer M. Clinical validation of a structural porous tantalum biomaterial for adult reconstruction. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am.)*, 2004, vol. 86-A, suppl. 2, pp. 123–129.
14. Levine B. C. A new era in porous metals: Applications in orthopaedics. *MetFoam 2007: Porous metals and metallic forms: proceedings of the fifth International conference ...*, ed.: L. P. Lefebvre, J. Banhart, D. C. Dunand. Lancaster, 2008, pp. 251–254.
15. Ryan G. E., Pandit A. S., Apatsidis D. P. Porous titanium scaffolds fabricated using a rapid prototyping and powder metallurgy technique. *Biomaterials*, 2008, vol. 29, no. 27, pp. 3625–3635. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.032
16. Maslov A. P. Aspects of osteointegration of the helical cup of the hip joint endoprosthesis with reinforced cementless fixation. *Meditsina* [Medicine], 2013, no. 3, pp. 10–16 (in Russian).
17. Rutskii, A. V., Maslov A. P. Cementless endoprosthesis of the hip joint endoprosthesis own design. *Litopys travmatologii ta ortopedii* [The Chronicle of Traumatology and Orthopedics], 2006, no. 1/2, pp. 31–36 (in Russian).

Информация об авторах

Маслов Алексей Петрович – д-р мед. наук, доцент, заведующий отделением. Минская областная клиническая больница (а. г. Лесной, 1, Минский район, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: tut.tut@tut.by.

Королько Андрей Степанович – гл. врач. Минская областная клиническая больница (а. г. Лесной, 1, Минский район, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: budenithi@mail.ru.

Соловей Александр Николаевич – врач ортопед-травматолог. Минская областная клиническая больница (а. г. Лесной, 1, Минский район, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: sasha.solovei@tut.by.

Information about the authors

Alexei P. Maslov – D. Sc. (Med.), Assistant Professor, Head of the Department. Minsk Regional Clinical Hospital (1, a/g Lesnoy, Minsk district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: tut.tut@tut.by.

Andrei S. Korolko – Chief doctor. Minsk Regional Clinical Hospital (1, a/g Lesnoy, Minsk district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: budenithi@mail.ru.

Alexandr N. Solovei – doctor orthopedist-traumatologist. Minsk Regional Clinical Hospital (1, a/g Lesnoy, Minsk district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: sasha.solovei@tut.by.

Е. Б. Белоновская¹, Е. Е. Нарута¹, О. Я. Лукивская¹, О. А. Казючиц², В. У. Буко¹

¹Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Республика Беларусь

²Республиканское производственное унитарное предприятие «АКАДЕМФАРМ»,
Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ И ПЕНТОКСИФИЛЛИНА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Аннотация. Фиброз печени является типичным ответом на хроническое воспаление печеночной ткани вследствие различных заболеваний. Фиброз – это динамический процесс, приводящий к тяжелым осложнениям: развитию цирроза, гепатоцеллюлярной карциноме, печеночной недостаточности. Учитывая социальную значимость проблемы, поиск новых, более эффективных препаратов, обладающих гепатозащитным и антифибротическим действием при фиброзе печени, является актуальной задачей.

Целью исследования было изучение влияния готовой лекарственной формы (ГЛФ) на основе комбинации урсодезоксихолевой кислоты (УДХК) и пентоксифиллина (ПТФ) на развитие CCl₄-индуцированного фиброза печени у крыс. Установлено, что введение ГЛФ в дозах, эквивалентных 40 и 80 мг/кг УДХК, в условиях токсического воздействия сопровождалось ослаблением активности маркерных ферментов, общего и связанного билирубина, снижением содержания оксипролина в печени, коллагена III, ламинина и TNF-α по сравнению с аналогичными показателями у крыс опытной группы, не получавших препараты, а также способствовало снижению уровня гиалуроновой кислоты, проколлагена III и TGF-β₁, причем действие высокой дозы ГЛФ, в отличие от малой, было более выраженным.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГЛФ обладает достаточно высоким терапевтическим потенциалом, проявляя противофиброзное, противовоспалительное и гепатопротективное действие в условиях токсического фиброза печени.

Ключевые слова: фиброз, печень, урсодезоксихолевая кислота, пентоксифиллин, комбинация, цитокины, крысы

Для цитирования: Влияние комбинации урсодезоксихолевой кислоты и пентоксифиллина на течение экспериментального фиброза печени / Е. Б. Белоновская [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 31–40.

Е. В. Belonovskaya¹, Е. Е. Naruta¹, О. Я. Lukivskaya¹, О. А. Kazyuchits², V. U. Buko¹

¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,
Grodno, Republic of Belarus

²State Enterprise "ACADEMPHARM", Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF THE COMBINATION OF URSODEOXYCHOLIC ACID AND PENTOXYPHILLINE ON EXPERIMENTAL LIVER FIBROSIS

Abstract. Hepatic fibrosis is a common result of different chronic liver diseases. Fibrosis is a dynamic process which can progress to complication, including cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and liver failure. Considering the significance of problem, the search for a new effective substance with hepatoprotective and antifibrotic effects on liver fibrosis is an actual task.

The aim of the study was to investigate the influence of fixed-dose combination (FDC) containing ursodeoxycholic acid (UDCA) 350 mg and pentoxifylline (PTX) 150 mg on the development of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in rats. The obtained results showed that FDC effectively reduced elevated serum markers enzyme activities, the hepatic hydroxyproline content, decreased levels of proinflammatory and profibrogenic cytokines. The histopathological analysis showed that FDC alleviated the severity of liver fibrosis induced by CCl₄. A high dose of FDC had the most positive effect.

Thus, the obtained results suggested that FDC has a sufficiently high therapeutic potential, demonstrating antifibrotic, antiinflammatory and hepatoprotective activities on experimental liver fibrosis.

Keywords: fibrosis, liver, ursodeoxycholic acid, pentoxifylline, combination, cytokines, rats

For citation: Belonovskaya E. V., Naruta E. E., Lukivskaya O. Y., Kazyuchits O. A., Buko V. U. Influence of the combination of ursodeoxycholic acid and pentoxifylline on experimental liver fibrosis. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 31–40 (in Russian).

Введение. Фиброз печени является типичным ответом на хроническое воспаление печеночной ткани вследствие различных заболеваний и характеризуется разрастанием соединительной (фиброзной) ткани в органе с нарушением микроциркуляции. Наиболее частыми причинами его развития являются вирусные гепатиты, алкогольный и неалкогольный стеатогепатиты, токсические гепатиты, иммунные и эндокринные заболевания [1–3]. На сегодняшний день фиброз и цирроз печени занимают лидирующие позиции среди причин инвалидности и смертности населения во всем мире. По данным ВОЗ, в Европе цирроз печени обуславливает 1,8 % всех случаев смерти (около 170 тыс. случаев смерти ежегодно) [4]. В Беларуси показатель смертности от цирроза печени в 2014 г. составил 16,0 на 100 тыс. населения [5]. Согласно проведенным исследованиям, показатель заболеваемости циррозом печени, являющимся одной из шести наиболее распространенных причин смерти среди лиц трудоспособного возраста в экономически развитых странах [6], будет расти за счет увеличения заболеваемости неалкогольным стеатогепатитом и вирусным гепатитом С.

При фиброзе печени наблюдается нарушение динамического равновесия между процессами фиброгенеза и фибролиза в сторону усиления продукции и накопления внеклеточного матрикса (ВКМ), снижения деградации его элементов. Центральное место в процессе фиброгенеза принадлежит активации основных эффекторных клеток (в первую очередь звездчатых клеток печени (ЗКП)) и трансформации их в миофибробластоподобные клетки. Именно эти клетки являются главными продуцентами внеклеточных матриксных компонентов (коллагена I, III, IV, фибронектина, гиалуроновой кислоты) в поврежденной печени. В результате воздействия этиологических факторов и повреждения гепатоцитов выделяется большое количество провоспалительных цитокинов, являющихся взаимными индукторами: фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкин-6 (ИЛ-6), эндотелин-1, тромбоцитарный фактор роста (PDGF) [7]. Важная роль в формировании фиброза печени принадлежит ключевому профиброгенному цитокину – трансформирующему фактору роста β_1 (TGF- β_1), обладающему выраженным паракринным/аутокринным действием на ЗКП и стимулирующим синтез ВКМ. Установлена тесная взаимосвязь между прогрессированием фиброза печени и ангиогенезом [8]. Развитие фиброза приводит к гипоксии печеночной ткани, что служит пусковым механизмом для новообразования сосудов. Кроме того, фиброз печени, являясь процессом динамическим, вызывает тяжелые осложнения: развитие цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы, печеночной недостаточности [9].

Учитывая социальную значимость проблемы, поиск новых эффективных препаратов, обладающих гепатозащитным и противofiброзным действием при фиброзе печени, является актуальной задачей. Научные достижения последних лет свидетельствуют, что фиброз печени может иметь обратимый характер [10–12], а, следовательно, эффективная антифибротическая терапия сможет обеспечить благоприятный прогноз уже при развившемся патологическом процессе. В качестве таких препаратов используют агенты, ингибирующие активацию ЗКП и их эффекты (антиоксиданты, антагонисты эндотелин-рецепторов, ингибиторы TGF- β_1 , TNF- α , ангиотензин-превращающий фермент [13]), устраняющие воспалительные и иммунные нарушения (глюкокортикоиды, интерфероны, синтетические аналоги нуклеозидов), донаторы оксида азота, агонисты рецепторов, активизирующих пролиферацию пероксисом, препараты растительного происхождения. Среди них значимое место занимают препараты урсодезоксихолевой кислоты (УДХК). Ее с успехом применяют для лечения первичного билиарного цирроза печени [14, 15], склерозирующего холангита, стеатогепатитов различной этиологии [16–18]. Однако ни один из препаратов, назначаемый в качестве монотерапии, не соответствует требованиям «идеального».

В настоящее время предпочтение в лечении фиброза печени отдается комбинированной терапии с использованием нескольких агентов (как правило, принадлежащих к различным группам), которые активно воздействуют на различные звенья патогенеза, препятствуя развитию патологического процесса. В последнее время в качестве перспективного гепатопротективного и противofiброзного препарата, вызывающего интерес, рассматривается пентоксифиллин (ПТФ). На протяжении многих лет ПТФ применяется для улучшения микроциркуляции и реологических свойств крови [19, 20]. Недавние экспериментальные исследования показали, что ПТФ обладает противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами [21], уменьшает синтез

провоспалительных цитокинов, в первую очередь ФНО- α [22, 23], а также проявляет противомышечный эффект, подавляя выработку промиоцитарных цитокинов (TGF- β , IFN- γ) и экспрессию коллагена I [24].

Цель настоящего исследования – изучить влияние готовой лекарственной формы на основе комбинации урсодезоксихолевой кислоты и пентоксифиллина на развитие экспериментального токсического фиброза печени у крыс.

Материалы и методы исследования. Исследование проводили на белых крысах-самцах с исходной массой 230–250 г. Животные содержались на стандартном рационе вивария и получали полноценный корм и воду без ограничений. Эксперименты выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также с требованиями Директивы Европейского этического комитета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 г. и правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях» от 18.03.1986 г. и ТКП 125–2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденный постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь (№ 56 от 28.03.2008 г.).

Фиброз печени вызывали путем внутрижелудочного введения 20 %-ного раствора CCl_4 (на вазелиновом масле) из расчета 0,2 мл на 100 г массы тела животного, 3 раза в неделю в течение 6 недель. ГЛФ представляла собой композицию, содержащую 350 мг УДХК, 150 мг ПТФ и вспомогательные вещества до общей массы ядра таблетки 1 г (разработан и изготовлен на ГП «АКАДЕМ-ФАРМ»). Все животные, участвующие в эксперименте, были разделены на 4 группы (по 8 особей в каждой): группа 1 (контрольная) – крысы, получавшие вазелиновое масло; группа 2 – животные с CCl_4 -индуцированным поражением печени без введения препаратов; группы 3, 4 – животные, получавшие ГЛФ в дозах, эквивалентных 40 и 80 мг/кг УДХК в перерасчете на 1 кг массы животного на фоне интоксикации CCl_4 . Начиная с 4-й недели опыта и до конца эксперимента ежедневно интрагастрально вводили ГЛФ в виде суспензии в 0,8 %-ной гипомеллозе. Спустя 6 недель от начала эксперимента животных подвергали декапитации под эфирным наркозом. Материалом для исследования являлись кровь, взятая натошак из шейной вены, и ткань печени. Забор материала производили в утреннее время с 9 до 10 ч. Сыворотку крови, полученную путем центрифугирования при 3000 об/мин, использовали для определения биохимических показателей.

Для проведения морфологического исследования небольшие фрагменты правой доли печени крыс фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина, приготовленного на 0,07 М фосфатном буфере (рН 7,0). Обезжизнение материала производили в этиловом спирте возрастающей концентрации с последующей заливкой в гистомикс («БиоВитрум», Россия). Срезы толщиной 5 мкм для обзорных исследований грубых морфологических нарушений окрашивали гематоксилином и эозином, а также по сложному многокрасочному методу Маллори, позволяющему специфично окрасить соединительную ткань. Для морфометрической оценки относительной площади соединительной ткани в печени применяли метод полуколичественного компьютерного анализа результатов. Морфометрический анализ проводили согласно общепринятым рекомендациям [25] с использованием программы ImageJ 1.46 (NIH, США). На стандартной площади среза (не менее 15 полей зрения с каждого гистологического среза) измеряли площадь структур, окрашенных в синий цвет, и вычисляли ее процентное отношение к выбранной стандартной площади. Микрофотосъемку случайных полей зрения гистологических препаратов выполняли цифровой фотокамерой Olympus C-5660 (Япония), установленной на микроскоп Olympus CX-41, при увеличении окуляра WNB $\times 10$, 20 и объективов PlanCN $10 \times 0,25$, $40 \times 0,65$.

Активность таких ферментов, как аланин- (АлАТ) и аспаратаминотрансфераза (АсАТ), щелочная фосфатаза (ЩФ) в сыворотке крови, концентрации общего и связанного билирубина измеряли с помощью наборов реактивов фирмы «ООО Анализ Х» (Минск, Беларусь) согласно прилагаемым инструкциям. Содержание оксипролина в печени определяли по методу Jamall [26]. Уровни TNF- α , TGF- β_1 , IFN- γ определяли, используя тест-систему Quantikine (R&D Systems GmbH, Германия), а содержание коллагена-III, проколлагена-III, ламинина, гиалуроновой кислоты – с помощью наборов USCN (Китай).

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

Результаты и их обсуждение. При исследовании морфологической картины печени животных контрольной группы установлено, что структура паренхимы печени у них была типичной для нормального органа и характеризовалась радиально расположенными трабекулами гепатоцитов в печеночных дольках. Внутридольковые синусоиды не расширены (рис. 1, *a*). Портальные тракты интактны, без признаков клеточной инфильтрации. Признаки воспалительной реакции паренхимы печени отсутствовали. Соединительная ткань визуализировалась в области капсулы, триад и у стенки центральной вены долек, что соответствовало ее нормальному положению (рис. 2, *a*). Введение CCl_4 приводило к выраженному нарушению citoархитектоники органа за счет развития фиброза печеночной ткани. Избыточная пролиферация соединительной ткани наблюдалась в области портальных трактов и центральных вен с образованием порто-портальных и порто-центральных септ, в отдельных случаях отмечалось образование единичных ложных долек (рис. 2, *b*). Портальные тракты были расширены, имели признаки гемосидероза и выраженной пролиферации эпителия желчных протоков. Отмечались дистрофические изменения гепатоцитов в виде выраженной гидропической, средне- и крупновезикулярной жировой дистрофии с локализацией в центролобулярных зонах. Наблюдался выраженный клеточный и ядерный полиморфизм гепатоцитов (частые митозы, двухъядерные и гигантские клетки). Имели место

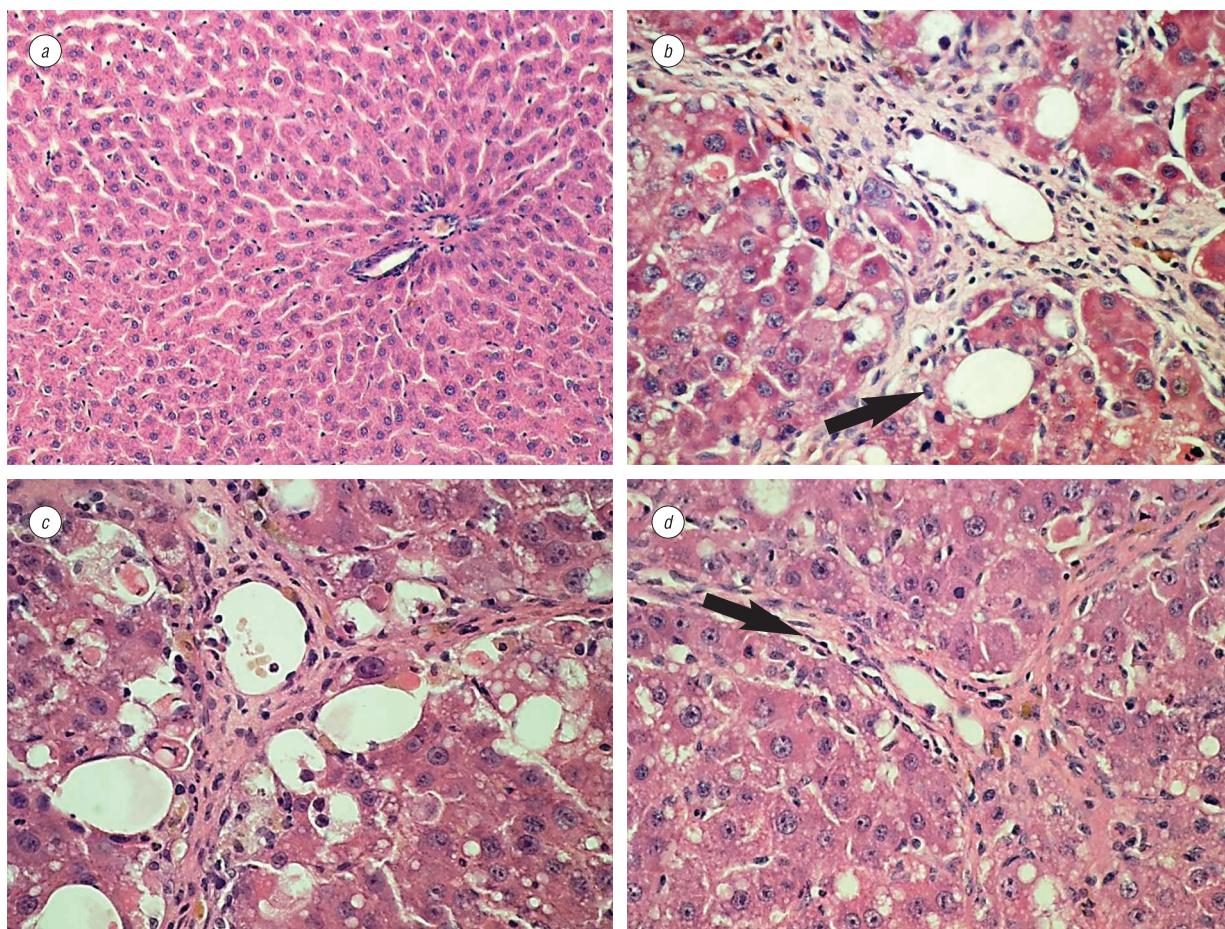


Рис. 1. Гистологическая картина печени крыс контрольной и опытных групп: *a* – нормальное строение печени (контрольная группа); *b* – CCl_4 -индуцированный фиброз печени, разрастание соединительной ткани вокруг портальных трактов, признаки гидропической и жировой дистрофии гепатоцитов (указано стрелкой); *c, d* – дегенерация гепатоцитов и фиброза у животных опытных групп, получавших ГЛФ в дозах 40 (*c*) и 80 (*d*) мг/кг (снижение степени при введении высокой дозы ГЛФ указано стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Fig. 1. Histological picture of the rat liver in the control and test groups: *a* – normal structure of liver (control group); *b* – CCl_4 -treated, proliferation of connective tissue around portal triad, signs ballooning and fatty degeneration of hepatocytes (indicated by an arrow); *c, d* – degeneration level of hepatocytes and fibrosis in the groups administrated FDC in a dose of 40 (*c*) and 80 (*d*) mg/kg (a decrease in the degree at administration of a large dose of FDC is indicated by an arrow). Haematoxylin and eosin stain. $\times 400$

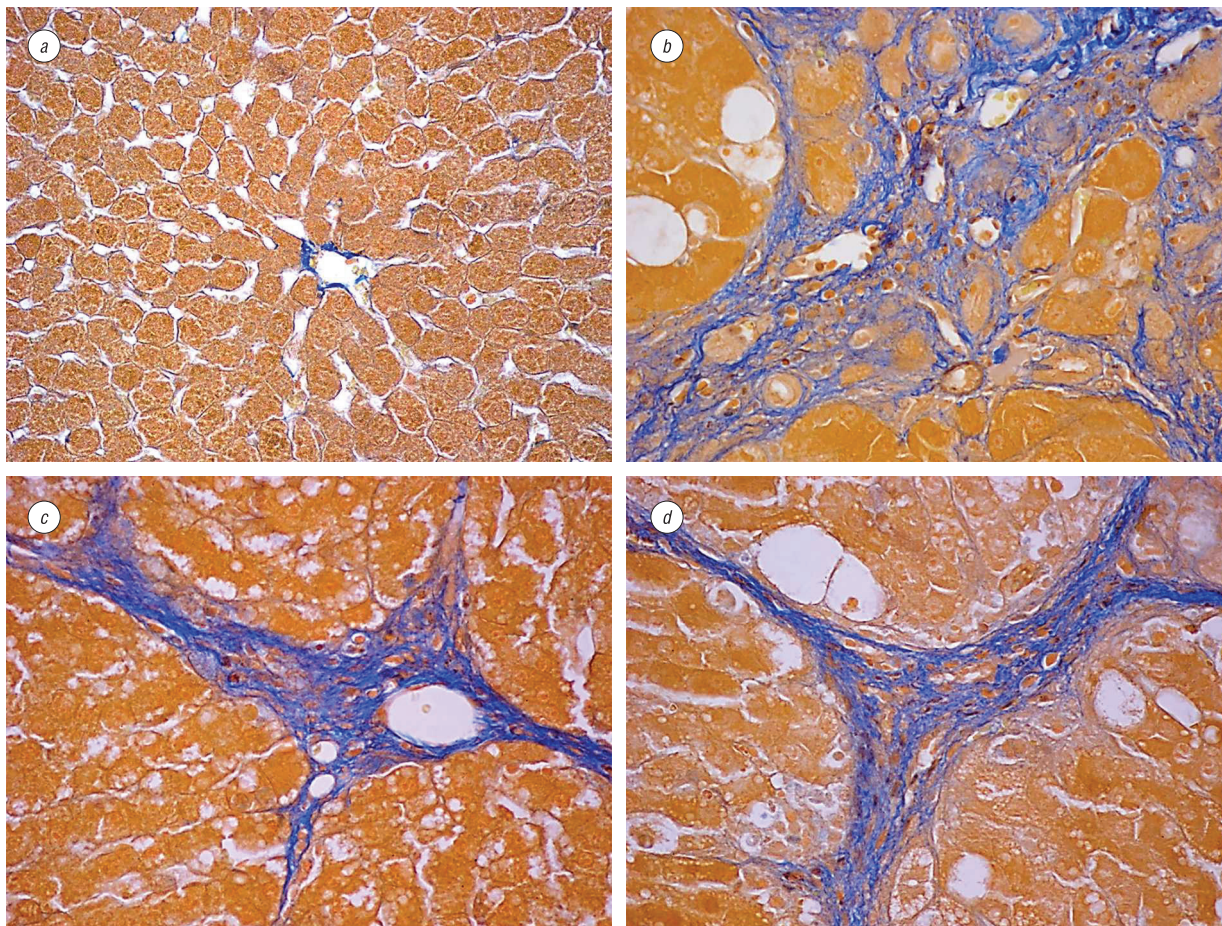


Рис. 2. Разрастание соединительной ткани печени крыс (окрашивание синим цветом на гистологических срезах печени) в контрольной (а) и опытных (b – при CCl_4 -индуцированном фиброзе печени; c, d – при введении ГЛФ в дозах 40 (c) и 80 (d) мг/кг соответственно) группах. Окраска по методу Маллори. $\times 400$

Fig. 2. Proliferation of a connective tissue of rats (blue color on histological liver sections) in control group (a) and (b – CCl_4 -induced liver fibrosis; c, d – FDC in a dose of 40 (c) and 80 (d) mg/kg respectively) in test groups. Mallory's stain. $\times 400$

фокальные некрозы гепатоцитов, проявляющиеся наличием дистрофичной гомогенной цитоплазмы и отсутствием ядер. В области портальных трактов и по ходу фиброзных прослоек наблюдалась выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация (см. рис. 1, b). На срезах печени, окрашенных по методу Маллори, относительная площадь соединительной ткани в 6 раз превышала контрольные значения и составляла 10,04 % (рис. 3, a).

Структурные изменения печени при воздействии токсического агента сопровождалось значительными изменениями биохимических показателей крови. Как видно из данных, представленных в табл. 1, при введении тетрахлорметана отмечалось статистически значимое по сравнению с показателями у контрольных животных, получавших вазелиновое масло, повышение активности маркерных ферментов – АсАТ и АлАТ (на 79 и 126 % соответственно), ЩФ (в 4,5 раза), обусловленное цитолизом гепатоцитов. Также наблюдалось значительное повышение содержания ключевого показателя пигментного обмена – билирубина крови. Содержание общего билирубина в сыворотке крови крыс и его связанной фракции было в 2,5 раза выше, чем в контрольной группе.

Уровень оксипролина в печени животных, получавших CCl_4 , был повышен более чем в 2,7 раза (рис. 3, b). При исследовании содержания сывороточных маркеров фиброгенеза выявлено увеличение уровня гиалуроновой кислоты на 59 %, ламинина – на 102, коллагена III и проколлагена III – на 242 и 300 % соответственно. Анализ основных провоспалительных цитокинов сыворотки у животных показал увеличение уровня $\text{TNF-}\alpha$ на 113 %, $\text{IFN-}\gamma$ – на 258 %. Содержание в сыворотке крови ключевого медиатора, стимулирующего фиброгенную реакцию ЗКП, $\text{TGF-}\beta 1$, увеличилось на 93 % (табл. 2).

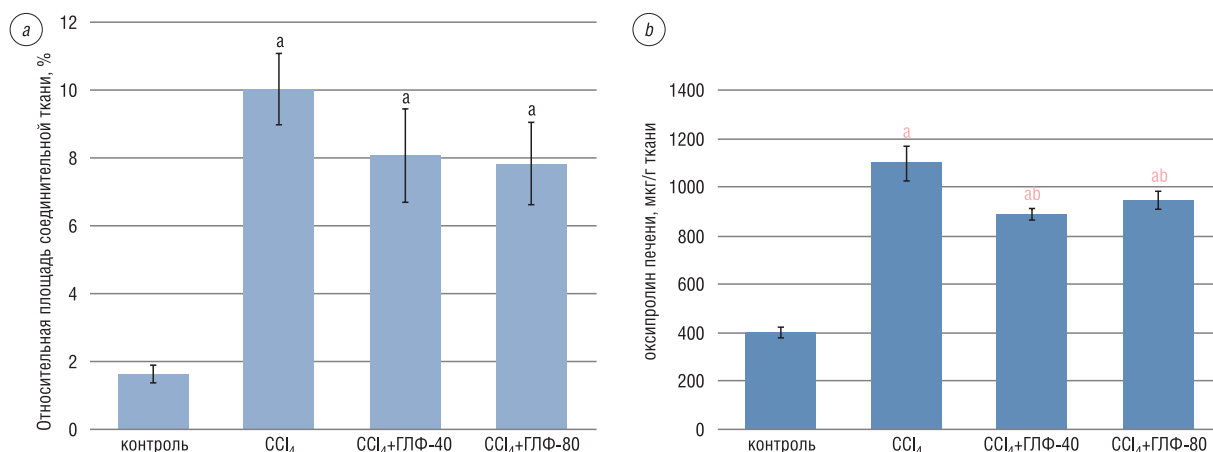


Рис. 3. Показатели относительной площади (%) соединительной ткани (а) и оксипролина (мкг/г ткани) в печени (b) крыс контрольной и опытных групп. Достоверность различий ($p < 0,05$): а – по отношению к контролю; b – по отношению к группе животных с индуцированным фиброзом печени без введения ГЛФ

Fig. 3. Indices of a relative area (%) of connective tissue (a) and hydroxyproline (mg/g tissue) in the rat liver (b) in the control and test groups. Reliability of differences: a – in relation to the control group; b – in relation to the group of liver fibrosis rats without treatment

Т а б л и ц а 1. Биохимические показатели сыворотки крови крыс контрольной и опытных групп (M±SD)
T a b l e 1. Biochemical parameters of blood serum of rats in the control and test groups (M±SD)

Показатель	Контроль	CCl ₄	CCl ₄ + ГЛФ-40	CCl ₄ + ГЛФ-80
АсАТ, Е/л	98,5±7,85	176,1±5,02 ^a	154,7±7,66 ^{ab}	137,2±6,34 ^{ab}
АлАТ, Е/л	53,1±2,89	120,1±2,77 ^a	105,2±3,63 ^{ab}	99,34±3,71 ^{ab}
ЩФ, Е/л	168,2±8,10	758,8±42,34 ^a	605,2±31,00 ^{ab}	575,8±55,61 ^{ab}
Билирубин связ., мкмоль/л	1,79±0,179	4,46±0,313 ^a	3,39±0,372 ^a	2,76±0,210 ^{ab}
Билирубин общ., мкмоль/л	3,86±0,176	9,10±0,837 ^a	7,19±0,647 ^a	5,37±0,312 ^{ab}

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий ($p < 0,05$) здесь и в табл. 2: а – по отношению к контролю; b – по отношению к группе животных с индуцированным фиброзом печени без введения ГЛФ.

Т а б л и ц а 2. Содержание маркеров воспаления и фиброгенеза в сыворотке крови крыс контрольной и опытных групп (M±SD)

T a b l e 2. Serum markers of inflammation and liver fibrogenesis of rats in the control and test groups (M±SD)

Показатель	Контроль	CCl ₄	CCl ₄ + ГЛФ-40	CCl ₄ + ГЛФ-80
TNF-α, пг/мл	6,45±9	13,72±0,65 ^a	10,28±0,39 ^{ab}	9,12±0,35 ^{ab}
IFN-γ, пг/мл	33,69±3,06	120,5±19,02 ^a	68,18±8,68 ^{ab}	63,23±10,85 ^{ab}
TGF-β ₁ , нг/мл	55,55±2,78	107,00±5,54 ^a	98,56±3,96 ^a	88,65±5,20 ^{ab}
Гиалуроновая к-та, пг/мл	7,08±0,57	11,26±0,54 ^a	9,57±0,64 ^a	9,35±0,36 ^{ab}
Ламинин, нг/мл	7,62±0,30	15,40±0,71 ^a	13,52±0,82 ^{ab}	10,78±0,58 ^{ab}
Коллаген-III, нг/мл	42,0±3,7	143,5±7,7 ^{ab}	108,9±11,6 ^{ab}	92,8±10,3 ^{ab}
Проколлаген-III, нг/мл	52,44±1,63	157,4±8,7 ^a	136,6±6,7 ^a	125,5±9,4 ^{ab}

При введении ГЛФ в дозах 40 и 80 мг/кг признаки фиброза печени сохранялись. Однако, в отличие от опытной группы, в печени животных, получавших ГЛФ в обеих дозах, явления фиброза были не столь выражены: соединительнотканые септы, отходящие от фиброзированных сосудов, были короткие и слепо заканчивались в паренхиме печени (рис. 2, c, d). У животных обеих групп наблюдалось снижение степени гидропической и жировой дистрофии гепатоцитов. Инфильтрация портальных трактов и прослоек соединительной ткани лимфо-

гистиоцитарными клетками по степени выраженности была аналогична таковой в опытной группе (см. рис. 1, *c, d*). Относительная площадь соединительной ткани составила 8,08 и 7,83 % соответственно (рис. 3, *a*).

Введение ГЛФ в обеих дозах на фоне интоксикации тетрахлорметаном приводило к статистически достоверному уменьшению активности маркерных ферментов (АлАТ, АсАТ, ЩФ), снижению содержания оксипролина в печени (рис. 3, *b*), общего и связанного билирубина (см. табл. 1), коллагена III, ламинина и TNF- α по сравнению с аналогичными показателями крыс опытной группы, не получавших препараты. Установлено, что введение указанных доз ГЛФ способствовало также снижению уровней гиалуроновой кислоты, проколлагена III и TGF- β_1 , причем действие высокой дозы ГЛФ, в отличие от малой, было достоверным и более выраженным (табл. 2).

Полученные в ходе эксперимента результаты свидетельствуют о том, что введение тетрахлорметана в течение 6 недель вызывает у подопытных животных грубые структурные нарушения, характерные для фиброза печени. Доказательством поражения печени явилось и нарушение функционального состояния гепатоцитов, проявляющееся значительными сдвигами биохимических показателей сыворотки крови. Достоверное повышение содержания оксипролина, основного компонента коллагена, проколлагена III, коллагена I и III, ламинина, гиалуроновой кислоты, указывали на интенсивность синтеза экстрацеллюлярного коллагенового матрикса и снижение деградации его компонентов. Высокие уровни сывороточных цитокинов, IFN- γ , TNF- α , TGF- β_1 свидетельствовали о значительной степени воспалительной активности и фиброгенной реакции ЗКП. Применение ГЛФ, содержащей ПТФ и УДХК в изучаемых дозах, в течение 3 недель на фоне действия гепатотоксина замедляло прогрессирование патологических изменений в печени, снижая активность цитолитических ферментов, уровни основных провоспалительных цитокинов, содержание прямых маркеров фиброгенеза в сыворотке крови.

Доказательством высокой противοфиброзной активности ГЛФ служило уменьшение признаков фиброза печени, а также достоверное снижение уровня оксипролина. Следует отметить, что ГЛФ в дозе 80 мг/кг оказывала более выраженное действие при фиброзе печени, достоверно снижая содержание как основного профиброгенного цитокина, TGF- β_1 , так и некоторых сывороточных маркеров фиброгенеза: гиалуроновой кислоты и проколлагена III. Кроме того, ГЛФ обладала выраженным гепатопротективным действием, снижая активность маркерных цитолитических ферментов и содержание общего и связанного билирубина в сыворотке крови. Гепатопротективный эффект ГЛФ подтверждался гистологически снижением степени гидропической дистрофии гепатоцитов и стеатоза. Обе дозы ГЛФ оказывали противοвоспалительное действие, способствуя снижению содержания в сыворотке крови TNF- α , являющегося основным цитокином, модулирующим процессы воспаления, и IFN- γ , активирующего синтез белков острой фазы воспаления.

Ранее нами установлен противοфиброзный эффект УДХК при фиброзе печени, индуцированном тиоацетамидом [27]. УДХК оказывает цитопротективное действие, связываясь с мембраной гепатоцитов, стабилизируя ее и делая устойчивой к повреждающему действию тетрахлорметана. Исследования *in vitro* показали, что УДХК способна замедлять развитие фиброза печени путем влияния на передачу сигналов TGF- β_1 /Smad в звездчатых клетках [28].

Литературные данные указывают и на противοфиброзный потенциал ПТФ. Наши исследования продемонстрировали положительное действие ПТФ на разрешение тиоацетамидного фиброза печени: введение его в дозе 20 мг/кг массы тела животным с развившимся фиброзом уменьшало количество соединительной ткани и уровень оксипролина в печени за счет повышения экспрессии мРНК интерстициальной коллагеназы ММП-13 [29]. ПТФ, являясь неселективным ингибитором фосфодиэстеразы, ингибирует ключевые сигнальные пути фиброгенеза печени, обладает способностью подавлять выработку TNF- α и образование коллагена [30].

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что комбинированное использование УДХК и ПТФ в виде ГЛФ может быть целесообразным при коррекции фиброза печени не только за счет аддитивности их противοфиброзных свойств, но и в связи с защитой клеток паренхимы печени этими субстанциями и их способностью угнетать воспалительные процессы в печени.

Заключение. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемая ГЛФ на основе УДХК и пентоксибиллина обладает достаточно высоким терапевтическим потенциалом, проявляя противомембранное, противовоспалительное и гепатопротективное действие при экспериментальном фиброзе печени, вызванном тетрахлорметаном. Это является одним из оснований для заключения о перспективности применения такой комбинации препаратов в клинической практике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Bataller, R. Liver fibrosis / R. Bataller, D. A. Brenner // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 209–218.
2. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases / T. A. Poynard [et al.] // *J. Hepatol.* – 2003. – Vol. 38. – P. 257–265.
3. Mormone, E. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches / E. Mormone, J. George, N. Nieto // *Chem. Biol. Interac.* – 2011. – Vol. 193, N 3. – P. 225–231.
4. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe / W. A. Zatonsky [et al.] // *Eur. Addict. Res.* – 2010. – Vol. 16, N 4. – P. 193–201.
5. Смертность в Республике Беларусь за 2014–2015 гг. : офиц. стат. сб. за 2014–2015 гг. / Респ. науч.-практ. центр мед. технологий, информатизации, управления и экономики здравоохранения. – Минск : Респ. науч. мед. б-ка, 2016. – 208 с.
6. Ивашкин, В. Т. Лечение осложнений цирроза печени / В. Т. Ивашкин, М. В. Маевская. – М. : Литтерра, 2011. – 64 с.
7. Parsons, C. J. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis / C. J. Parsons, M. Takashima, R. A. Rippe // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – Vol. 22, iss. 1. – P. 79–84.
8. Lemos, Q. T. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis / Q. T. Lemos, Z. A. Andrade // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2010. – Vol. 105, iss. 5. – P. 611–614.
9. Tsochatzis, E. A. Liver cirrhosis / E. A. Tsochatzis, J. Bosch, A. K. Burroughs // *Lancet.* – 2014. – Vol. 383. – P. 1749–1761.
10. Bonis, P. A. Is liver fibrosis reversible? / P. A. Bonis, S. L. Friedman, M. M. Kaplan // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 344. – P. 452–454.
11. Liaw, Y. F. Reversal of cirrhosis: an achievable goal of hepatitis B antiviral therapy / Y. F. Liaw // *J. Hepatol.* – 2013. – Vol. 59. – P. 880–881.
12. Ellis, E. L. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis / E. L. Ellis, D. A. Mann // *J. Hepatol.* – 2012. – Vol. 56, N 5. – P. 1171–1180.
13. Kang, Q. Curcumin suppresses expression of low-density lipoprotein (LDL) receptor, leading to the inhibition of LDL-induced activation of hepatic stellate cells / Q. Kang, A. Chen // *Br. J. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 157, iss. 8. – P. 1354–1367.
14. Hirschfield, G. M. Progress in the genetics of primary biliary cirrhosis / G. M. Hirschfield, P. Invernizzi // *Semin. Liver Dis.* – 2011. – Vol. 31, iss. 2. – P. 147–156.
15. Risk factors and prediction of long-term outcome in primary biliary cirrhosis / H. Ishibashi [et al.] // *Intern. Med.* – 2011. – Vol. 50, iss. 1. – P. 1–10.
16. Эффективность урсодезоксихолевой кислоты в лечении больных холестатической формой алкогольной болезни печени и первичным билиарным циррозом / Е. Н. Широкова [и др.] // *РЖГГК.* – 2007. – № 3. – С. 52–58.
17. High dose ursodeoxycholic acid as a therapy for patients with primary sclerosing cholangitis / D. M. Harnois [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2001. – Vol. 96. – P. 1558–1562.
18. Xiang, Z. The role of ursodeoxycholic acid in non-alcoholic steatohepatitis / Z. Xiang, Y. P. Chen, K. F. Ma // *BMC Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 13, N 1. – P. 140.
19. Sha, M. The efficacy of pentoxifylline in the treatment of vascular dementia / M. Sha, C. Callahan // *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* – 2003. – Vol. 17, iss. 1. – P. 46–54.
20. Хронические цереброваскулярные расстройства – современные подходы к лечению / П. П. Камчатнов [и др.] // *Рус. мед. журн.* – 2008. – Т. 16, № 6. – С. 358–361.
21. Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis / P. Ocunieff [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – Vol. 22, iss. 11. – P. 2207–2213.
22. O’Shea, R. S. Alcoholic liver disease / R. S. O’Shea, S. Dasarathy, A. J. McCullough // *J. Hepatol.* – 2010. – Vol. 51, N 1. – P. 307–328.
23. Beneficial effects of tumor necrosis factor-alpha inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis / S. K. Satapathy [et al.] // *Am. J. of Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 99, iss. 10. – P. 1946–1952.
24. Rokey, D. C. Antifibrotic therapy in chronic liver disease / D. C. Rokey // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – Vol. 3, N 2. – P. 95–107.
25. Автандилов, Г. Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1980. – 216 с.

26. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis / J.J. Cho [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2000. – Vol. 118, N 6. – P. 1169–1178.
27. Protective effects of norursodeoxycholic acid versus ursodeoxycholic acid on thioacetamide-induced rat liver fibrosis / V.U. Buko [et al.] // *J. Clin. Exp. Hepatol.* – 2014. – Vol. 4, N 4. – P. 293–301.
28. Ursodeoxycholic acid treatment improves hepatocyte ultrastructure in rat liver fibrosis / N. Mas [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 14, N 7. – P. 1108–1111.
29. Resolution of thioacetamide induced liver fibrosis in rats treated with pentoxifylline / V.U. Buko [et al.] // *J. Hepatol.* – 2007. – Vol. 46, suppl. 1. – S80.
30. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis // C. Raetsch [et al.] // *Gut.* – 2002. – Vol. 50, N 2. – P. 241–247.

References

1. Bataller R., Brenner D. A. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, vol. 115, pp. 209–218. DOI: 10.1172/JCI24282
2. Poynard T. A., Mathurin P., Lai C. L., Guyader D., Poupon R. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology*, 2003, vol. 38, pp. 257–265.
3. Mormone E., George J., Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chemico-Biological Interactions*, 2011, vol. 193, no. 3, pp. 225–231. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/943497>
4. Zatonsky W. A., Sulkovska U., Manczuk M. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe. *European Addiction Research Journal*, 2010, vol. 16, no. 4, pp. 193–201. DOI: 1159/000317248
5. *Mortality in Republic of Belarus. An official statistics collection, 2014–2015*. Minsk, Respublikanskaya meditsinskaya nauchnaya biblioteka [Republican Scientific Medical Library], 2016. 208 p. (in Russian).
6. Ivashkin V. T., Maevskaja M. V. *Treatment of liver cirrhosis complications*. Moscow, Litterra Publ., 2011, 64 p. (in Russian).
7. Parsons C. J., Takashima M., Rippe R. A. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2007, vol. 22, suppl. 1, pp. 79–84. DOI: 10.1111/j.1440–1746.2006.04659.x
8. Lemos Q. T., Andrade Z. A. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, vol. 105, no. 5, pp. 611–614.
9. Tsochatzis E. A., Bosch J., Burroughs A. K. Liver cirrhosis. *Lancet*, 2014, vol. 383, pp. 1749–1761. DOI: 10.1016/S0140–6736(14)60121–5
10. Bonis P. A., Friedman S. L., Kaplan M. M. Is liver fibrosis reversible? *The New England Journal of Medicine*, 2001, vol. 344, pp. 452–454. DOI: 10.1136/gut.46.4.443
11. Liaw Y.F. Reversal of cirrhosis: an achievable goal of hepatitis B antiviral therapy. *Journal of Hepatology*, 2013, vol. 59, pp. 880–881. DOI: <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.268>
12. Ellis E. L., Mann D. A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 2012, vol. 56, no. 5, pp. 1171–1180.
13. Kang Q., Chen A. Curcumin suppresses expression of low-density lipoprotein (LDL) receptor, leading to the inhibition of LDL-induced activation of hepatic stellate cells. *British Journal of Pharmacology*, 2009, vol. 157, no. 8, pp. 1354–1367. DOI: 10.1111/j.1476–5381.2009.00261.x
14. Hirschfield G. M., Invernizzi P. Progress in the genetics of primary biliary cirrhosis. *Seminars in Liver Disease*, 2011, vol. 31, no. 2, pp. 147–156.
15. Ishibashi H., Komori A., Shimoda S., Ambrosini Y. M., Gershwin M. E., Nakamura M. Risk factors and prediction of long-term outcome in primary biliary cirrhosis. *Internal Medicine*, 2011, vol. 50, no. 1, pp. 1–10.
16. Shirokova E. N., Kuznetcova Ye. L., Mayevskaya M. V. Effective of ursodeoxycholic acid in the treatment of patients with cholestatic form of alcoholic liver disease and primary biliary cirrhosis. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2007, no. 3, pp. 52–58 (in Russian).
17. Harnois D. M., Angulo P., Jorgensen R. A., Larusso N. F., Lindor K. D. High dose ursodeoxycholic acid as a therapy for patients with primary sclerosing cholangitis. *American Journal of Gastroenterology*, 2001, vol. 96, pp. 1558–1562.
18. Xiang Z., Chen Y. P., Ma K. F. The role of ursodeoxycholic acid in non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterology*, 2013, vol. 13, no. 1, p. 140. DOI: 10.1186/1471–230X-13-140
19. Sha M., Callahan C. The efficacy of pentoxifylline in the treatment of vascular dementia. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 2003, vol. 17, no. 1, pp. 46–54. DOI: 10.1097/00002093–200301000–00006
20. Kamchatnov P. R., Radysh B., Glushkov K. S., B. Chugunov A. V. Chronic cerebrovascular disorders – modern approaches to treatment. *Russkij medicinskij zhurnal* [Russian Medical Journal], 2008, vol. 16, no. 6, pp. 358–361 (in Russian).
21. Ounieff P., Augustine E., Hicks J., Cornelison T. L., Altemus R. M., Naydich B. G., Ding I., Huser A. K., Abraham E. H., Smith J. J., Coleman N., Gerber L. H. Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, vol. 22, no. 11, pp. 2207–2213.
22. O’Shea R. S., Dasarathy S., McCullough A. J. Alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology*, 2010, vol. 51, no. 1, pp. 307–328. DOI: 10.1002/hep.23258
23. Satapathy S. K., Garg S., Chauhan R., Sakhuja P., Malhotra V., Sharma B. C. Beneficial effects of tumor necrosis factor-alpha inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Gastroenterology*, 2004, vol. 99, no. 10, pp. 1946–1952. DOI: 10.1111/j.1440–1746.2006.04756.x

24. Rokey D. C. Antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2005, vol. 3, no. 2, pp. 95–107.
25. Avtandilov G. G. *Introduction to quantitative pathological morphology*. Moscow, Medicine, 1980. 216 p. (in Russian).
26. Cho J. J., Hocher B., Herbst H., Jia J. D., Ruehl M., Hahn E. G., Riecken E. O., Schuppan D. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Journal of Gastroenterology*, 2000, vol. 118, no. 6, pp. 1169–1178. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(00\)70370-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(00)70370-2)
27. Buko V. U., Lukivskaya O. Y., Naruta E. E., Belonovskaya E. B., Tauschel H. D. Protective effects of norursodeoxycholic acid versus ursodeoxycholic acid on thioacetamide-induced rat liver fibrosis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 293–301. DOI: 10.1016/j.jceh.2014.02.001
28. Mas N., Tasci I., Comert B., Ocal R., Mas M. R. Ursodeoxycholic acid treatment improves hepatocyte ultrastructure in rat liver fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 2008, vol. 14, no. 7, pp. 1108–1111. DOI: 10.3748/wjg.14.1108
29. Buko V. U., Popov Y. V., Lis R. E., Zaks J., Schuppan D., Lukivskaya O. Y. Resolution of thioacetamide induced liver fibrosis in rats treated with pentoxifylline. *Journal of Hepatology*, 2007, vol. 46, suppl. 1, S80.
30. Raetsch C., Jia J. D., Boigk G., Bauer M., Hahn E. G., Riecken E. O., Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary billiary fibrosis. *Gut*, 2002, vol. 50, no. 2, pp. 241–247.

Информация об авторах

Белоновская Елена Брониславовна – науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: ms.belonovskaya@yandex.ru.

Нарута Елена Евграфовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: naruta@list.ru.

Лукивская Оксана Ярославовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК-50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vu.buko@tut.by.

Казючиц Ольга Александровна – канд. биол. наук. Республиканское производственное унитарное предприятие «Академфарм» (ул. акад. Купревича, 5/3, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ifb@academpharm.by.

Бuko 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

Elena B. Belonovskaya – 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: ms.belonovskaya@yandex.ru.

Elena E. Naruta – 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: naruta@list.ru.

Oxana Y. Lukivskaya – 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: vu.buko@tut.by.

Olga A. Kazyuchits – Ph. D. (Biol.). State Enterprise “ACADEMPHARM” (5/3, Ac. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ifb@academpharm.by.

Vyacheslav U. Buko – 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.

С. В. Ткачев, Е. Г. Фомина, Е. Е. Григорьева, Е. П. Счесленок, П. А. Семижон, Т. В. Школина,
О. В. Маханько, А. С. Владыко

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь*

СИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНОГО C_H2-C_H3 УЧАСТКА Fc-ФРАГМЕНТА IgG1 ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЫШИНЫХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Аннотация. В клетках *E. coli* синтезирован рекомбинантный белок rFc IgG, представляющий собой C_H2 и C_H3 домены Fc-фрагмента γ-цепи IgG1 человека. Белок rFc IgG является полидетерминантным антигеном, содержащим линейные эпитопы для антител к IgG человека. Проведена иммунизация мышей белком rFc IgG. Показано, что rFc IgG обладает высокой иммуногенностью для мышей и может быть использован для получения антивидовых поликлональных антител к IgG человека. Обнаружено, что мышиные поликлональные антитела к rFc IgG проявляют слабо выраженную перекрестную реактивность в отношении IgM человека, а кроме того, выявлена высокая вариабельность значений титров антител, полученных от разных животных. Для решения этих проблем предлагается проводить оценку качества материала, полученного в результате каждой иммунизации, и отбирать подходящие образцы антител с учетом их авидности, специфичности и титра.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, Fc-фрагмент иммуноглобулина G, антиген, антивидовые поликлональные антитела, иммунизация мышей

Для цитирования: Синтез рекомбинантного C_H2-C_H3 участка Fc-фрагмента IgG1 человека и его использование для получения мышиных поликлональных антител / С. В. Ткачев [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 41–47.

S. V. Tkachov, E. G. Fomina, E. E. Grigorieva, E. P. Scheslenok, P. A. Semizhon, T. V. Shkolina, O. V. Mahanko,
A. S. Vladyko

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

SYNTHESIS OF RECOMBINANT POLYPEPTIDE INCLUDING C_H2-C_H3 DOMAINS OF THE HUMAN IgG1 Fc-FRAGMENT AND ITS USE FOR MOUSE POLYCLONAL ANTIBODY PRODUCTION

Abstract. The recombinant polypeptide rFc IgG containing the amino acid sequence of the C_H2 and C_H3 domains of the Fc-fragment of the human IgG γ-chain was produced in *Escherichia coli*. The polypeptide rFc IgG is an antigen with many linear epitopes for human IgG. Wild-type mice were immunized with rFc IgG to obtain immune ascitic fluids containing polyclonal antibodies against human IgG. It was shown that rFc IgG was highly immunogenic for mice and could be used to produce polyclonal antibodies against human IgG. It was revealed that mouse polyclonal antibodies slightly cross-reacted with human IgM, in addition a high variability of titers of antihuman Ig derived from different mice was found. To solve these problems, it was offered to assess the quality of material obtained after every immunization and to select suitable antibody samples with appropriate avidity, specificity and titer.

Keywords: recombinant protein, Fc-fragment of immunoglobulin G, antigen, anti-species polyclonal antibodies, immunization of mice

For citation: Tkachov S. V., Fomina E. G., Grigorieva E. E., Scheslenok E. P., Semizhon P. A., Shkolina T. V., Mahanko O. V., Vladyko A. S. Synthesis of recombinant polypeptide including C_H2-C_H3 domains of the human IgG1 Fc-fragment and its use for mouse polyclonal antibody production. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 41–47 (in Russian).

Введение. В настоящее время для продукции антител используют две основные стратегии: получение поликлональных антисывороток путем иммунизации животных соответствующим иммуногеном и гибридомную технологию синтеза моноклональных антител (МАТ). Выбор между этими стратегиями определяется возможностями конкретной лаборатории и задачами, которые предполагается решать с использованием полученных антител. И тот и другой способ обладают своими преимуществами и недостатками [1, 2]. К основному недостатку первого способа

можно отнести то, что поликлональная антисыворотка, полученная в результате иммунизации животных, содержит гетерогенные популяции антител, обладающие различной специфичностью и аффинностью по отношению к конкретному антигену и группе похожих антигенов [1–3].

Специфичность поликлональных антител (пАТ) можно повысить, ограничив количество эпитопов полидетерминантного иммуногена. При этом следует учитывать, что специфичность полученных антител должна соответствовать характеру работ, которые предстоит выполнить с их применением. Например, антитела, входящие в состав ферментного конъюгата, используемого для выявления комплекса антиген-IgG, должны распознавать все IgG, связанные с антигеном, следовательно, их специфичность должна быть ограничена на уровне класса антител.

Анализ спектра пАТ, синтезированных мышами в ответ на иммунизацию целой молекулой человеческого IgG, показал, что большинство антител вырабатывается на структурные и линейные антигенные детерминанты, локализованные в Fc-фрагменте IgG [3, 4]. В пределах C_H2 и C_H3 доменов IgG человека были идентифицированы участки, формирующие линейные эпитопы для взаимодействия с пан-IgG. Картирование эпитопов мАТ (pepscan analysis) выявило последовательности 290-KPREE-294 и 338-КАКГQPR-344, расположенные соответственно в C_H2 домене и N-регионе C_H3 домена и присутствующие у всех четырех классов IgG [5]. Также известно, что участок 383-SNGQPEN-390 выявляется пан-специфичными мАТ у всех подклассов IgG [6]. Гомология C_H3 доменов подклассов IgG составляет 96 %, C_H2 домена – 90–95, участка иммуноглобулинов, находящегося между C_H1 и C_H2 доменами (шарнирный фрагмент), – 50–60 % (для сравнения: гомология аминокислотных последовательностей Fc фрагмента различных классов иммуноглобулинов составляет ~30 % [7]). Можно предположить, что изолированный участок IgG человека, состоящий из консервативных C_H2 и C_H3 доменов, может быть использован в качестве иммуногена для индукции у животных поликлональных антител, обладающих панспецифичностью в отношении IgG человека и неспецифичных к иммуноглобулинам других классов.

Цель данного исследования – с помощью технологии рекомбинантной ДНК осуществить в клетках *E. coli* синтез мономерного Fc-фрагмента IgG1 человека (rFc IgG), включающего константные области γ-цепи IgG (домены C_H2 и C_H3), и оценить возможность его использования для получения мышиных пАТ, обладающих реактивностью в отношении IgG человека.

Материалы и методы исследования. *Бактериальные штаммы.* Штаммы *E. coli* XL-blue и BL21(DE3) использовали для проведения генно-инженерных работ и получения rFc IgG соответственно.

Выделение РНК и проведение ПЦР. В качестве прототипа генетической конструкции, содержащей необходимую нуклеотидную последовательность, использовали участок (709–1368 п. н.), кодирующий C_H2 и C_H3 домены γ-цепи IgG1 человека (GenBank, JX292764.2). РНК, необходимую для синтеза кДНК, выделяли из клеточной лимфобластной линии IM-9, продуцирующей IgG человека. Для выделения РНК использовали набор реагентов TRI Reagent (Sigma, США). Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью реакции обратной транскрипции и последующей ПЦР с применением набора реагентов OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Германия). Праймеры для ПЦР приведены в таблице. Для клонирования амплифицированных фрагментов в экспрессирующий вектор рJC40 в праймеры были включены сайты узнавания для HindIII и XhoI рестриктаз.

Конструирование рекомбинантной плазмиды. В качестве экспрессирующего вектора использовали плазмиду рJC40. Рестриктию вектора и амплифицированных фрагментов проводили с помощью HindIII и XhoI рестриктаз (Thermo Fisher Scientific, США). Реакционная смесь содержала по 0,2 мкг ампликона и векторной ДНК, буфер для ферментов рестрикции (Thermo Fisher Scientific, США) и по 1 U каждого фермента рестрикции. После проведения реакции ферменты рестрикции инактивировали в течение 20 мин при 80 °С. Лигирование фрагментов и вектора осуществляли в течение 20 мин при 22 °С в 20 мкл буфера (30 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ

ПЦР-праймеры для синтеза кДНК, кодирующей Fc IgG
PCR primers for synthesis of cDNA coding of Fc IgG

Праймер	Последовательность
Прямой	5' – CGCGAAGCTTCCCGTCCCAGCACCT – 3'
Обратный	3' – GCGCCTCGAGTTTACCCGGAGACAG – 5'

Примечание. Сайты узнавания для HindIII и XhoI рестриктаз выделены курсивом.

и по 1 U каждого фермента рестрикции. После проведения реакции ферменты рестрикции инактивировали в течение 20 мин при 80 °С. Лигирование фрагментов и вектора осуществляли в течение 20 мин при 22 °С в 20 мкл буфера (30 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ

MgCl₂, 10 mM ДТТ, 1 mM АТФ), содержащего 0,2 мкг ДНК и 1 U ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli*, штамм XL-blue.

Трансформация E. coli XL-blue рекомбинантной плазмидой. Колонии клеток *E. coli* XL-blue вносили в 5 мл LB-бульона (Sigma, США), помещали в термостат при 37 °С и инкубировали в течение 2–3 ч до достижения культурой логарифмической фазы роста. Далее культуру охлаждали до 4 °С и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл 0,1 M CaCl₂. В бактериальную культуру вносили 10 мкл лигазной смеси, выдерживали 30 мин при 4 °С, после чего добавляли 900 мкл LB-бульона и инкубировали 60 мин при 37 °С. После инкубации клетки осаждали путем центрифугирования в течение 5 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в 100 мкл среды. Трансформированные клетки высевали на селективную среду, содержащую 50 мкг/мл ампициллина (Sigma, США). Выросшие колонии проверяли на наличие рекомбинантной плазмиды методом электрофореза в 1 %-ном агарозе. Плазмидную ДНК из клеток выделяли с помощью набора QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, Германия).

Экспрессия rFc IgG. Трансформацию *E. coli* BL21(DE3) рекомбинантной плазмидой и выращивание клеток в питательной среде проводили, как описано выше. Биосинтез целевого белка индуцировали внесением в питательную среду изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в концентрации 0,4 mM. Экспрессия белка в клетках *E. coli* сопровождалась образованием телец включения.

Тельца включения выделяли из клеточной массы следующим способом. Клетки *E. coli* (100 мл бактериальной культуры) осаждали путем центрифугирования (5000 об/мин, 10 мин), супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл буфера (0,5 M NaCl, 20 mM трис-HCl, pH 7,9). Затем клеточную суспензию обрабатывали 4 раза ультразвуком (20 кГц, 20 с) на льду, лизаты центрифугировали при 5000 об/мин, выпавшие в осадок тельца включения ресуспендировали в 100 мкл 10 mM фосфатно-солевого буфера (ФСБ; 0,15 M NaCl, pH 7,4). Для оценки содержания белка тельца включения растворяли в 0,05 %-ном додецилсульфате натрия (ДСН), концентрацию белка определяли с помощью набора Roti-Quant universal (Carl Roth, Германия). Выход очищенного белка составлял ~1,5 мг на 100 мл культуры клеток.

Электрофорез, вестерн-блот. Белки клеточных лизатов разделяли электрофорезом в 15 %-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с 0,1 % ДСН по методу Laemmli [8]. Гель окрашивали в растворе Coomassie R-250. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого электроблоттинга с использованием прибора Criterion Blotter (BioRad, США). Для детекции rFc IgG использовали мышиные антитела против IgG (или IgM) человека, меченные пероксидазой хрена (Invitrogen, США).

Иммунизация мышей, получение иммуноасцитических жидкостей (ИАЖ). Для получения ИАЖ использовали нелинейных белых мышей в возрасте 8–12 недель массой 18–20 г. Иммунизацию проводили с помощью телец включения, содержащих rFc IgG. Первоначально суспензию иммуногена вводили подкожно в дозе 10 мкг белка/мышь в полном адьюванте Фрейнда (Sigma, США), через 14 сут материал вводили повторно в дозе 20 мкг белка/мышь в неполном адьюванте Фрейнда (Sigma, США). Через 21 сут после последней подкожной инъекции иммуноген вводили внутрибрюшинно в полном адьюванте Фрейнда в дозе 30 мкг белка/мышь, через 14 сут инъекцию повторяли, дозу белка увеличивали до 40 мкг белка/мышь. ИАЖ, содержащую пАТ, отбирали пункцией из перитонеальной полости мыши.

Проведение ИФА. Наличие пАТ к IgG человека в ИАЖ оценивали методом ИФА. Для этого на поверхность лунок иммунологического планшета (Greiner, Германия) сорбировали IgG (или IgM) человека (Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл. Затем в лунки вносили ИАЖ, разведенные ФСБ, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты промывали ФСБ. Далее в лунки вносили поликлональные козьи антитела к IgG мыши, меченные пероксидазой хрена (Invitrogen, США), инкубировали 1 ч при комнатной температуре, промывали ФСБ и добавляли цитратно-фосфатный буфер, содержащий H₂O₂ и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Через 15 мин реакцию останавливали путем добавления 2 M H₂SO₄. Оптическую плотность (ОП) образцов измеряли при 450 нм. В качестве холостых проб использовали асцитическую жидкость мышей, которым вводили растворы для иммунизации, не содержащие rFc IgG.

Средние значения ОП₄₅₀ холостых проб составили $0,053 \pm 0,0013$ ($n = 6$) и $0,056 \pm 0,012$ ($n = 6$) при проведении реакции с IgG и IgM соответственно. При оценке результатов эксперимента считали, что проба содержит специфические иммуноглобулины, если ее ОП превышает среднее значение ОП холостых проб в 2 раза (уровень cut off).

Результаты и их обсуждение. Фрагмент кДНК, кодирующий Fc IgG, был амплифицирован, очищен и клонирован в вектор pJC40 по HindIII и XhoI сайтам рестрикции. Рекомбинантной плазмидной ДНК pJC40-FcIgG трансформировали клетки *E. coli* XL-blue. Присутствие в клетках *E. coli* рекомбинантной плазмиды определяли с помощью рестрикционного анализа по сайтам HindIII и XhoI (рис. 1). Анализ показал, что плазида pJC40-FcIgG, содержащая вставку, менее подвижна в агарозном геле, чем исходный вектор pJC40, при этом обработка рестриктазами делила ее на два фрагмента, один из которых по размеру соответствовал вектору pJC40 (2402 п. н.), второй – клонированной вставке FcIgG (680 п. н.).

Конструкцию pJC40-FcIgG использовали для экспрессии rFcIgG в *E. coli* BL21(DE3). В процессе экспрессии в клетках продуцента наблюдали образование нерастворимых телец включения. С помощью электрофореза в денатурирующих условиях установлено, что тельца включения сформированы белком с молекулярной массой около 32 кДа, что соответствовало ожидаемой массе для rFc IgG, а также практически не содержали примесей бактериальных белков. В растворимой клеточной фракции rFc IgG был выявлен в незначительных количествах (рис. 2, а).

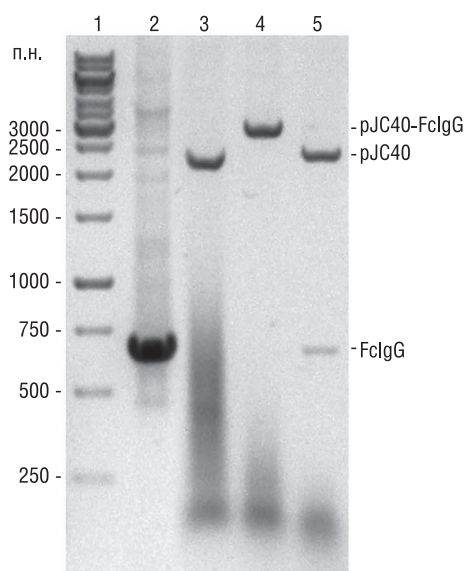


Рис. 1. Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pJC40-FcIgG и исходного вектора pJC40: 1 – маркер длины ДНК (Thermo Scientific, США); 2 – амплификат, полученный с парой праймеров, ограничивающих домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека; 3 – рестрикция pJC40 по HindIII сайту; 4 – рестрикция pJC40-FcIgG по HindIII сайту; 5 – рестрикция pJC40-FcIgG по HindIII и XhoI сайтам

Fig. 1. Restriction analysis of the recombinant plasmid pJC40-FcIgG and the original vector pJC40: 1 – DNA sizes marker (Thermo Scientific, USA); 2 – PCR-product received with two primers by limiting C_H2 and C_H3 domains of human IgG1; 3 – restriction of pJC40 in HindIII site; 4 – restriction of pJC40-FcIgG in XhoI site; 5 – restriction of pJC40-FcIgG in HindIII and XhoI sites

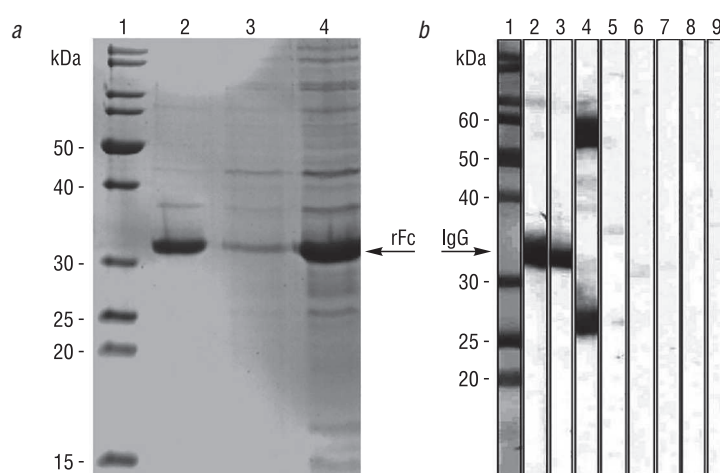


Рис. 2. Идентификация rFc IgG во фракциях лизата *E. coli* BL21(DE3) методом ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле (а) и оценка антигенной специфичности rFc IgG методом вестерн-блот (б) (а: 1 – маркер молекулярных масс; 2 – фракция лизата, содержащая тельца включения; 3 – супернатант, полученный после осаждения телец включения; 4 – лизат после индукции ИПТГ синтеза rFc IgG; б: 1 – маркер молекулярных масс; 2, 6 – лизат после индукции ИПТГ синтеза rFc IgG; 3, 7 – фракция лизата, содержащая тельца включения; 4, 8 – коммерческий IgG человека; 5, 9 – лизат нативной культуры *E. coli* BL21(DE3)). В качестве выявляющего реагента для образцов 2–5 использовали мышинный анти-IgG пероксидазный конъюгат, для образцов 6–9 – мышинный анти-IgM пероксидазный конъюгат

Fig. 2. Identification of rFc IgG in lysate fractions of *E. coli* BL21(DE3) by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (a) and valuation antigen specificity of rFc IgG by Western-blot method (b) (a: 1 – molecular weight marker; 2 – lysate fraction containing an including body 3 – supernatant after sedimentation of an including body; 4 – lysate after IPTG induce rFc IgG expression; b: 1 – molecular weight marker; 2, 6 – lysate after IPTG induce rFc IgG expression; 3, 7 – lysate fraction containing an including body; 4, 8 – commercial human IgG; 5, 9 – lysate of native *E. coli* BL21(DE3) strain). As a detected tool, samples 2–5 used the mouse anti-human IgG peroxidase conjugate and samples 6–9 – the mouse anti-human IgM peroxidase conjugate

Способность rFc IgG выступать в качестве антигена по отношению к античеловеческим иммуноглобулинам оценивали с помощью вестерн-блот анализа. Показано, что rFc IgG реагирует с мышинными антителами против IgG человека, реакции rFc IgG с мышинными антителами против IgM человека не выявлено (рис. 2, *b*).

В следующей серии экспериментов изучали иммуногенные свойства rFc IgG. Исследования показали, что введение rFc IgG мышам индуцирует у животных выработку антител к IgG человека. Максимальное разведение ИАЖ, при котором в пробах фиксировали присутствие специфических антител к IgG человека, составило 10^6 раз (рис. 3, *a*). Также обнаружено, что введение rFc IgG стимулировало у мышей выработку антител, реагирующих с IgM человека. В данном случае положительный ответ регистрировали при разведении ИАЖ в 10^3 раз, при этом наблюдали разброс значений ОП в диапазоне 0,19–0,85 усл. ед. (рис. 3, *b*).

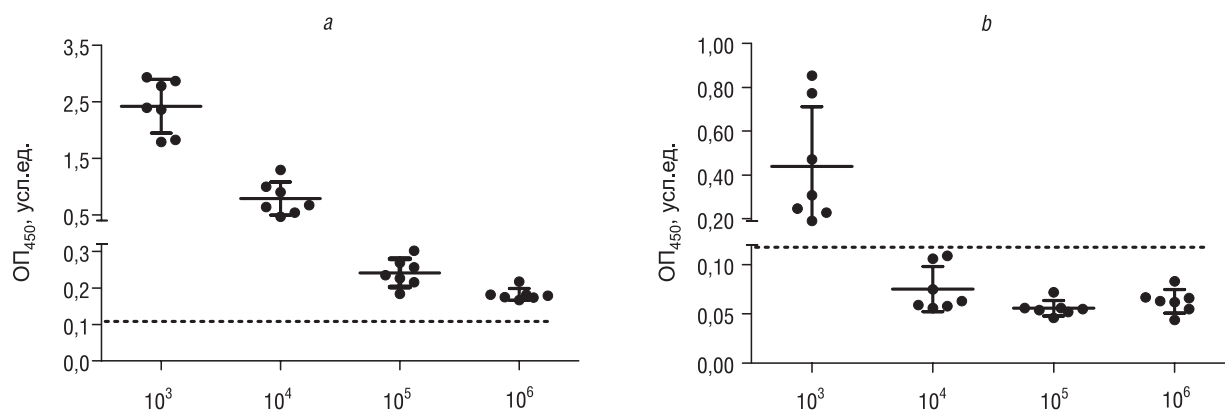


Рис. 3. Результаты ИФА по оценке реактивности ИАЖ, полученных после иммунизации мышей rFc IgG, по отношению к IgG (*a*) и IgM (*b*) человека. По горизонтали – разведение ИАЖ, разы; по вертикали – оптическая плотность (ОП₄₅₀), усл. ед.; ● – значения ОП₄₅₀ каждой отдельной пробы, горизонтальная черта – среднее значение ОП₄₅₀, вертикальная черта – стандартное отклонение, пунктирная линия – уровень cut off

Fig. 3. ELISA results for evaluation of the reactivity of immune ascetic fluids (IAF) after mouse immunization by rFc IgG in relation to human IgG (*a*) and human IgM (*b*). Horizontally – dilution of IAF, times; vertically – optical density (OD₄₅₀), rel. units; ● – value of OD₄₅₀ every distinct samples, horizontal line – average value of OD₄₅₀, vertical line – standard deviation, dashed line – cut off level

Заключение. Таким образом, нами получен рекомбинантный белок rFc IgG, представляющий собой C_H2 и C_H3 домены Fc-фрагмента γ-цепи IgG1 человека. Синтезированный белок можно рассматривать как полидетерминантный антиген, содержащий линейные эпитопы для антител к IgG человека. Показано, что rFc IgG обладает высокой иммуногенностью для мышей и может быть использован для получения антивидовых пАТ к IgG человека. Антитела к rFc IgG в данных условиях эксперимента (нелинейные животные, полидетерминантный антиген) формируются в результате функционирования множества клеточных клонов, что неизбежно должно приводить к гетерогенности материала [2], проявляющейся в нашем исследовании в виде перекрестной реактивности с IgM и высокой вариабельности значения титров антител, полученных от разных животных. Решение этих проблем, по всей видимости, лежит в оценке (верификации) качества материала, полученного в результате каждой иммунизации, и в отборе подходящих образцов антител с учетом их avidности, специфичности и титра [2].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. The production of polyclonal antibodies in laboratory animal. The report and recommendations of ECVAM workshop 35 / P. P. Leenaars [et al.] // ATLA. – 1999. – Vol. 27, N 1. – P. 79–102.
2. Кэтти, Д. Антитела. Методы : пер. с англ. / Д. Кэтти, Ч. Райкундалиа. – М. : Мир, 1991. – Т. 2. – 382 с.
3. Novotny, J. Location of antigenic epitopes on antibody molecules / J. Novotny, M. Handschumacher, E. Haber // J. Mol. Biol. – 1986. – N 4. – P. 715–721.

4. Hajjghasemi, F. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies recognizing human pan-IgG specific conformational or linear epitopes / F. Hajjghasemi, J. Khoshnoodi, F. Shokri // *Avicenna J. Med. Biotech.* – 2012. – Vol. 4, N 4. – P. 170–177.
5. Characterization of epitopes of pan-IgG/anti-G3m(u) and anti-Fc monoclonal antibodies / P. Nelson [et al.] // *Immunol. Lett.* – 2003. – Vol. 88, N 1. – P. 77–83.
6. Characterization of anti-IgG monoclonal antibody A57H by epitope mapping / N. Nelson [et al.] // *Biochem. Soc. Transact.* – 1997. – Vol. 25, N 2. – P. 373.
7. Schroeder Jr., H. W. Immunoglobulins: structure and function / H. W. Schroeder Jr., D. Wald, N. S. Greenspan // *Fundamental Immunology* / ed. W. E. Paul. – 7rd ed. – Philadelphia : Wolters Kluwer Health ; Lippincott Williams & Wilkins, 2013, XVIII. – 1283 p.
8. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.

References

1. Leenaars M., Hendriksen C. F. M., de Leeuw W. A., Carat F., Delahaut P., Fischer R., Halder M., Hanly W. C., Hartinger J., Hau J., Lindblad E. B., Nicklas W., Outschoorn I. M., Stewart-Tull D. E. S. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM workshop 35. *Alternatives to Laboratory Animals*, 1999, vol. 27, no. 1, pp. 79–102.
2. Catty D. *Antibodies: a practical approach*, vol. 2. Oxford, IRL Press, 1989. 280 p. (Russ. ed.: Ketti D., Raikundalia Ch. *Antitela. Metody* [Antibodies. Methods], vol. 2. Moscow, Mir Publ., 1991. 382 p.
3. Novotny J., Handschumacher M., Haber E. Location of antigenic epitopes on antibody molecules. *Journal of Molecular Biology*, 1986, no. 4, pp. 715–721. DOI: 10.1016/0022-2836(86)90502-4
4. Hajjghasemi F., Khoshnoodi J., Shokri F. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies recognizing human pan-IgG specific conformational or linear epitopes. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2012, vol. 4, no. 4, pp. 170–177.
5. Nelson P., Westwood O., Soltys A., Jefferis R., Goodall M., Baumforth K., Frampton G., Tribbick G., Roden D., Hay F. Characterization of epitopes of pan-IgG/anti-G3m(u) and anti-Fc monoclonal antibodies. *Immunology Letters*, 2003, vol. 88, no. 1, pp. 77–83. DOI: 10.1016/S0165-2478(03)00056-7
6. Nelson N., Westwood O., Jefferis R., Goodall M., Hay F. Characterization of anti-IgG monoclonal antibody A57H by epitope mapping. *Biochemical Society Transactions*, 1997, vol. 25, no. 2, p. 373.
7. Schroeder Jr. H. W., Wald D., Greenspan N. S. Immunoglobulins: structure and function. *Fundamental Immunology*, 7th ed., in Paul W. E. (ed.). Philadelphia, Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins, 2013, XVIII. 1283 p.
8. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685. DOI:10.1038/227680a0

Информация об авторах

Ткачев Сергей Викторович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pjc40@mail.ru.

Фомина Елена Георгиевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: feg1@tut.by.

Григорьева Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: grigus@mail.ru.

Счесленок Елена Павловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: elena_pavlovna@tut.by.

Семижон Павел Анатольевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavel5555@tut.by.

Information about the authors

Sergey V. Tkachov – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pjc40@mail.ru.

Yelena G. Fomina – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: feg1@tut.by.

Yelena E. Grigorieva – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grigus@mail.ru.

Elena P. Scheslionok – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: elena_pavlovna@tut.by.

Pavel A. Semizhon – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavel5555@tut.by.

Школина Татьяна Владимировна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь).

Маханько Ольга Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь).

Владыко Александр Станиславович – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vladuko@belriem.by.

Tatyana V. Shkolina – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus).

Olga V. Mahanko – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus).

Aleksandr S. Vladiko – D. Sc. (Med.), Professor, Chief researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vladuko@belriem.by.

И. В. Романова¹, А. Е. Гончаров¹, Н. И. Дударева²

¹Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь
²10-я городская клиническая больница, Минск, Республика Беларусь

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ

Аннотация. Оптимизированы условия постановки и учета теста активации базофилов (ТАБ) для лабораторной диагностики IgE-опосредованной аллергии. Установлены оптимальные условия хранения венозной крови для проведения ТАБ: не более 4 ч при температуре 18–25 °С. Адаптировано и обосновано преимущество применения фторбол-12-миристан-13-ацетата в качестве неспецифического положительного контроля. Исследована экспрессия молекул, относящихся к разным функциональным классам, на неактивированных и активированных базофилах. Показано, что молекулы CD11b, CD13, CD69, CD107a, CD164 и CD300a усиливают экспрессию на базофилах под влиянием антитела к IgE и могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров при постановке ТАБ.

Ключевые слова: аллергия, базофилы, маркеры дегрануляции, проточная цитометрия

Для цитирования: Романова, И. В. Оптимизация условий проведения теста активации базофилов / И. В. Романова, А. Е. Гончаров, Н. И. Дударева // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2017. – №4. – С. 48–59.

I. U. Ramanava¹, A. Y. Hancharou¹, N. I. Dudarava²

¹The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus
²10th City Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus

OPTIMIZATION OF BASOPHIL ACTIVATION TEST CONDITIONS

Abstract. The basophil activation test (BAT) is a perspective method for allergy diagnosis. However, the optimization and standardization of the method are required. The optimal conditions for the peripheral blood storage for BAT were established: the blood should be stored at room temperature (18–25 °C), and a test should be performed within 4 h after blood collection. The optimal positive control – phorbol 12-myristate 13-acetate was chosen due to effective basophil activation and low cost. The expression of molecules on both unstimulated and activated basophils was studied. It was shown that CD11b, CD13, CD69, CD107a, CD164 and CD300a molecules may be used to improve the BAT efficiency.

Keywords: allergy, basophils, degranulation markers, basophil activation test, flow cytometry

For citation: Ramanava I. U., Hancharou A. Y., Dudarava N. I. Optimization of basophil activation test conditions. *Vestsi Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 48–59 (in Russian).

Введение. Тест активации базофилов (ТАБ) в качестве метода диагностики гиперчувствительности немедленного типа впервые был предложен в 1994 г. Saint-Laudy [1]. В основу метода легли работы Е. Кнол [2], в которых было показано, что базофилы под влиянием IgE-опосредованной активации экспрессируют молекулу CD63. В процессе дегрануляции базофилов происходит интеграция мембраны гистаминсодержащих гранул с поверхностной мембраной, что приводит к высвобождению медиаторов, а также к появлению на поверхности клеток LAMP-молекулы CD63, которая практически не регистрируется на покоящихся базофилах [3]. Маркер дегрануляции базофилов – CD63, будучи исторически первым, наиболее часто применяется в диагностике IgE-опосредованной аллергии к различным аллергенам [4]. Хорошо изученным маркером, усиливающим экспрессию при активации базофилов, является также высокоспецифичная для базофилов молекула – CD203c [5]. Недостатком применения данной молекулы в качестве маркера активации является ее конститутивная экспрессия на базофилах, поэтому для диагностики используется такой довольно сложный для учета показатель, как интенсивность экспрессии. В последующие годы рядом авторов были предложены и другие молекулы для проведения ТАБ: CD13, CD107a, CD164, однако данные о степени изменения экспрессии выше-

указанных молекул на базофилах при их активации отсутствуют, что затрудняет их использование с целью диагностики аллергии [6].

Таким образом, в настоящее время для постановки ТАБ в арсенале специалистов фактически имеются всего два маркера активации базофилов: CD63 и CD203c. При этом CD203c является сложным для учета, что, соответственно, затрудняет его применение в клинической диагностике. Индивидуальные различия пациентов с IgE-опосредованной гиперчувствительностью в активации базофилов в ответ на внешние стимулы, а следовательно, и на степень изменения экспрессии CD63 служат основанием для поиска новых высокочувствительных и универсальных маркеров активации базофилов.

Другой нерешенной проблемой является отсутствие стандартизации при постановке ТАБ: имеющиеся протоколы (равно как и инструкции по применению к коммерческим тест-системам) рекомендуют зачастую совершенно разные условия хранения периферической крови, постановки реакции при использовании положительных контролей, преинкубации с интерлейкином-3 (ИЛ-3), выборе молекул-маркеров активации. Разные подходы к гейтированию базофилов, которые могут вносить существенный вклад в порой невысокую воспроизводимость ТАБ, исследованы нами ранее [7]. Таким образом, необходимость стандартизации метода, в частности выбор маркеров активации базофилов, сохраняет свою актуальность, что нашло отражение в позиционном документе Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСИ), датированном 2017 г. [8].

Цель исследования – оптимизация условий постановки теста активации базофилов: определение оптимального времени и температуры хранения образца периферической крови, выбор положительного контроля реакции, скрининг молекул, экспрессируемых базофилами, для оценки потенциала их использования в диагностике гиперчувствительности немедленного типа.

Объекты и методы исследований. Объектами для *in vitro* исследований служили 20 образцов периферической крови здоровых добровольцев, в анамнезе которых не отмечались аллергические реакции (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Забор крови производили из кубитальной вены в пробирку с гепарином в качестве антикоагулянта.

Определение оптимальных условий хранения крови для проведения ТАБ. Исследование активации базофилов под действием положительного контроля (моноклональное антитело anti-IgE (клон 4H10 (ExBio, Чехия)) проводили через 1, 4 и 24 ч после забора крови. Пробы периферической крови хранили при комнатной температуре (20 °С), в холодильнике при 4 °С и в термостате при 30 °С. Пробоподготовка заключалась в инкубации 100 мкл крови с антителом к IgE в течение 30 мин при 37 °С. После этого добавляли моноклональные антитела CD63 – FITC, клон CLBGran/12 (Beckman Coulter, США), CD123 – PE, клон SSDCLY107D2 (Beckman Coulter, США), HLA-DR – PE-Cy 7, клон Immu-357 (Beckman Coulter, США), CD203c – APC, клон NP4D6 (ExBio, Чехия), и оставляли пробы на 15 мин при 4 °С. Эритроциты лизировали раствором хлорида аммония (3 мл) на протяжении 10–15 мин при температуре 18–25 °С, а затем осаждали клетки путем центрифугирования при 250 g в течение 5 мин и производили их учет на проточном цитометре BD FACSCalibur.

Выбор положительного контроля. В качестве стимуляторов активации и дегрануляции базофилов использовали ряд веществ: человеческий рекомбинантный ИЛ-3 – 1 нг/мкл (Miltenyi Biotec, Германия), форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) – 2 нг/мл, дибутирил-цАМФ (дб-цАМФ) – 1 мкг/мл, анти-fMLPR – 1 мкл/мл, липополисахарид (ЛПС) *E. coli* – 100 нг/мл (все реагенты производства Sigma-Aldrich, США), моноклональное антитело anti-IgE (клон 4H10 (ExBio, Чехия)) – 1 мкг/мл. Кровь инкубировали с вышеперечисленными веществами в течение 30 мин при 37 °С. Для завершения активации базофилов пробы помещали в морозильную камеру (–20 °С) на 1 мин (стоп-реакция). Дальнейшую пробоподготовку проводили так же, как указано выше.

Скрининг маркеров активации базофилов. Для иммунофенотипирования базофилов инкубировали 100 мкл периферической крови со следующими моноклональными антителами производства Beckman Coulter, США: CD32 – PE (клон 2E1), CD40 – PE (клон MAB89), CD55 – PE (клон JS11KSC2.3), CD63 – FITC (клон CLBGran/12), CD95 – PE (клон 7C11), CD105 – PE (клон 1G2), CD161 – PE (клон 191B8); производства ExBio, Чехия: CD11b – APC (клон MEM-174), CD13 – PerCP-Cy5.5 (клон WM15), CD15 – PE (клон MEM-158), CD16 – PE (клон lnk16), CD62L – PE (клон

LT-TD180), CD69 – PE (клон FN50), CD73 – PE (клон AD2), CD106 – PE (клон STA), CD203c – APC (клон NP4D6), CD300a – PE (клон MEM-260); производства Miltenyi Biotec, Германия: CD33 – FITC (клон AC104.3E3), CD68 – FITC (клон Y1/82A), CD284 – APC (клон HTA125); производства Becton Dickinson, США: CD11c – PE-Cy7 (клон B-ly6), CD107a – PE-Cy 7 (клон H4A3), CD164 – PE (клон N6B6), CD195 – FITC (клон 2D7/CCR5), CD205 – PE (клон MG38); производства BioLegend, США: CD35 – PE (клон E11), CD197 – PE-Cy7 (клон G043H7), CD282 – PE (клон TL2.1); производства Thermo Fisher Scientific, США: CD43 – PE (клон DF-T1), CD54 – FITC (клон MEM-111) и производства Abcam, Великобритания: CD88 – PE (клон 20/70). Активацию базофилов проводили при 37 °C в течение 30 мин. После этого эритроциты лизировали 15 мин при комнатной температуре. С помощью центрифугирования клетки осаждали и производили их учет на проточном цитометре BD FACSCalibur. Данные анализировали при помощи программного обеспечения Weasel версии 3.0.2 [9].

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программ Statistica версии 12 (StatSoft, США), StatPlus версии 4.9 (AnalystSoft, Канада) [10, 11]. Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й перцентилей. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Определение оптимального времени хранения образца периферической крови для проведения ТАБ. Базофилы как объект исследования *ex vivo* весьма нестабильны и склонны к активации под действием различных неспецифических факторов, таких как резкие перепады температуры, длительное хранение и грубые манипуляции с образцом периферической крови, выделение базофилов на градиенте плотности и др. Для получения клинически значимых результатов ТАБ крайне важно отсутствие в отрицательном контроле признаков активации и дегрануляции базофилов, а продолжительность хранения образца крови не должна оказывать на это влияние. Образцы периферической крови исследовали через 1, 4 и 24 ч после забора. Данные промежутки времени были выбраны исходя из предполагаемого места забора крови (организации здравоохранения) с последующей доставкой в лабораторию для исследования. В течение 1 ч кровь может быть исследована при условии выполнении забора в учреждении, где находится лаборатория. В течение 4 ч образцы крови могут быть доставлены из одного учреждения в другое в пределах города. При заборе крови в другом районе или области для исследования образца понадобится приблизительно 24 ч.

Установлено, что длительное хранение образца крови приводит к двукратному увеличению процентного содержания CD63⁺ базофилов в отрицательном контроле, подвергшихся дегрануляции: 10,65 (9,11–13,69) % – через 24 ч после забора крови, 4,76 (1,64–5,87) % – через 1 ч после ее забора ($p < 0,001$). При этом интенсивность экспрессии CD203c достоверно не изменилась через 24 ч после забора крови (110,7 (90,5–164,1) усл. ед.) в сравнении со значением показателя через 1 ч после ее забора (141,0 (90,7–179,3) усл. ед.), хотя имелась тенденция к снижению интенсивности экспрессии. Данный факт может существенно повлиять на интерпретацию результатов ТАБ. Маркеры активации и дегрануляции базофилов при исследовании через 4 ч после забора крови достоверно не отличались от значений при исследовании через 1 ч ($p = 0,078$), но в то же время наблюдалась тенденция к усилению спонтанной дегрануляции, выявляемой по маркеру CD63. Следует отметить, что в исследовании Sturm с соавт. [12] также было показано, что экспрессия CD203c после 4 ч хранения начинает снижаться. Это подтверждается и полученными нами данными.

Таким образом, проведенные исследования показали, что время хранения образца крови не должно превышать 4 ч после забора крови. Более длительное хранение может привести к ложно-отрицательным результатам ТАБ.

Определение оптимальных температурных условий при хранении образцов периферической крови для проведения ТАБ. Учитывая, что образцы периферической крови пациентов для диагностики будут доставляться из различных медицинских учреждений, необходимо определить условия транспортировки и хранения образцов. Как указано выше, базофилы крайне нестабильны при резких перепадах температуры. Было проведено исследование активации базофилов

при хранении образца периферической крови при комнатной температуре (20 °С), в холодильнике (4 °С) и при температуре 30 °С (имитация хранения в летний период). Показано, что низкая температура хранения образца периферической крови (4 °С) перед проведением ТАБ приводит к подавлению процесса активации и дегрануляции базофилов. Относительное количество активированных базофилов при температуре 4 °С было ниже, чем при хранении их при комнатной температуре (CD63 – 16,4 (13,4–18,6) и 22,75 (18,6–27,6) % соответственно, $p = 0,034$). В то же время высокая температура оказывала негативное влияние на стабильность базофилов, при этом выявлено высокое процентное содержание базофилов, подвергшихся спонтанной дегрануляции в отрицательном контроле, что, вероятно, может приводить к ошибкам при проведении ТАБ. Так, в отличие от проб, хранившихся при комнатной температуре, доля хранившихся при 30 °С базофилов со спонтанной дегрануляцией достоверно выше (CD63 – 4,35 (3,7–5,8) и 8,65 (7,3–11,6) % соответственно, $p = 0,001$).

Таким образом, для оптимальной оценки теста активации базофилов хранение и транспортировка образца периферической крови должны осуществляться в условиях комнатной температуры (18–25 °С). В идеале постановка ТАБ должна выполняться непосредственно в том же учреждении, в котором осуществляется забор крови.

Выбор положительного контроля. Корректная интерпретация результатов теста активации базофилов требует наличия надежных отрицательного и положительного контролей. Отрицательный контроль необходим для оценки спонтанной активации базофилов и подразумевает инкубацию клеток в идентичных условиях, что и остальные пробы, но без использования активирующих факторов. С помощью положительного контроля оценивают способность базофилов дегранулировать в ответ на неспецифические стимулы, что позволяет исключить ложно-отрицательные реакции.

В исследовании был задействован ряд иммуноактивных веществ, способных к неспецифической активации клеток иммунной системы. Показано, что ИЛ-3 незначительно усиливает интенсивность и процент экспрессии молекулы CD63 (4,0 (2,6–5,6) %) на базофилах в сравнении с контролем. Однако ИЛ-3 является, в целом, потенциальным праймирующим агентом для базофилов, который усиливает ответ базофилов на другие стимулы [13]. Таким образом, ИЛ-3 целесообразнее использовать в качестве предварительной стимуляции слабыми аллергенами, например лекарственными средствами.

Установлено, что дибутирил-цАМФ и ЛПС обладают слабыми стимулирующими свойствами в отношении базофилов. Отсутствие, а в случае с ЛПС даже некоторое снижение интенсивности экспрессии CD203c и CD63 говорит о неприемлемости их использования в качестве положительного контроля (рис. 1).

Хемотаксический пептид fMLP активирует базофилы по IgE-независимому пути, связываясь с рецептором FPR-1, который активирует MAPK-киназу и фосфолипазу C. Пептид fMLP связывается с двумя рецепторами, экспрессируемыми на базофилах: с рецептором к формил-пептиду (FPR) и с формил-пептид-подобным рецептором 1 (FPRL1). Данные рецепторы активируют внутриклеточные способы активации, такие как MEK–ERK путь, что приводит к хемотаксису и высвобождению медиаторов, включая лейкотриен C4 и гистамин [14]. Использованное нами моноклональное антитело к рецептору fMLP, имитирующего воздействие fMLP, показало, что данный положительный контроль приводит к недостаточной активации базофилов (CD63 – 7,4 (5,9–11,8) %).

Механизмом действия ФМА на клетки является активация протеинкиназы C, что делает ФМА фактически универсальным активатором. Исходя из предшествующих исследований других клеточных популяций, а также данных литературы [15, 16], первоначальная концентрация ФМА, которая была использована в экспериментах, составляла 20–25 нг/мл. Однако при этом наблюдалось чрезмерно большое количество клеток, подвергшихся апоптозу или некрозу, что существенно затрудняло выделение региона базофилов на цитограммах. После проведения серии экспериментов было установлено, что оптимальная концентрация ФМА составляет 2 нг/мл. Воздействие на базофилы ФМА приводит к значительной активации клеток с увеличением интенсивности экспрессии CD203c и значимой дегрануляцией базофилов, определяемой по маркеру CD63 (31,6 (25,9–33,8) %). При этом содержание мертвых клеток

не превышало 5 %. Таким образом, в результате исследований в качестве положительного контроля с целью неспецифической активации базофилов нами выбран ФМА в небольшой концентрации (2 нг/мл). Помимо достаточной активации базофилов выбор также обусловлен невысокой стоимостью реагента.

Наличие такого феномена, как «неотвечающие базофилы» [17], требует использования второго положительного контроля, который подтверждал бы активацию базофилов при взаимодействии с рецепторами к IgE. С целью оценки специфической активации базофилов использовали моноклональное антитело к IgE (клон 4H10) (рис. 1). Установлено, что содержание дегранулирующих базофилов с применением данного положительного контроля составляет 58,9 (48,1–73,2) % по маркеру CD63, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к положительному контролю реакции.

Оценка маркеров активации и дегрануляции базофилов. Базофилы принимают активное участие в различных воспалительных реакциях, секретируют большое количество ИЛ-4, способствуя тем самым развитию иммунного ответа по Th2 типу. Функциональная активность базофилов, способность к миграции, ответ на специфические и неспецифические

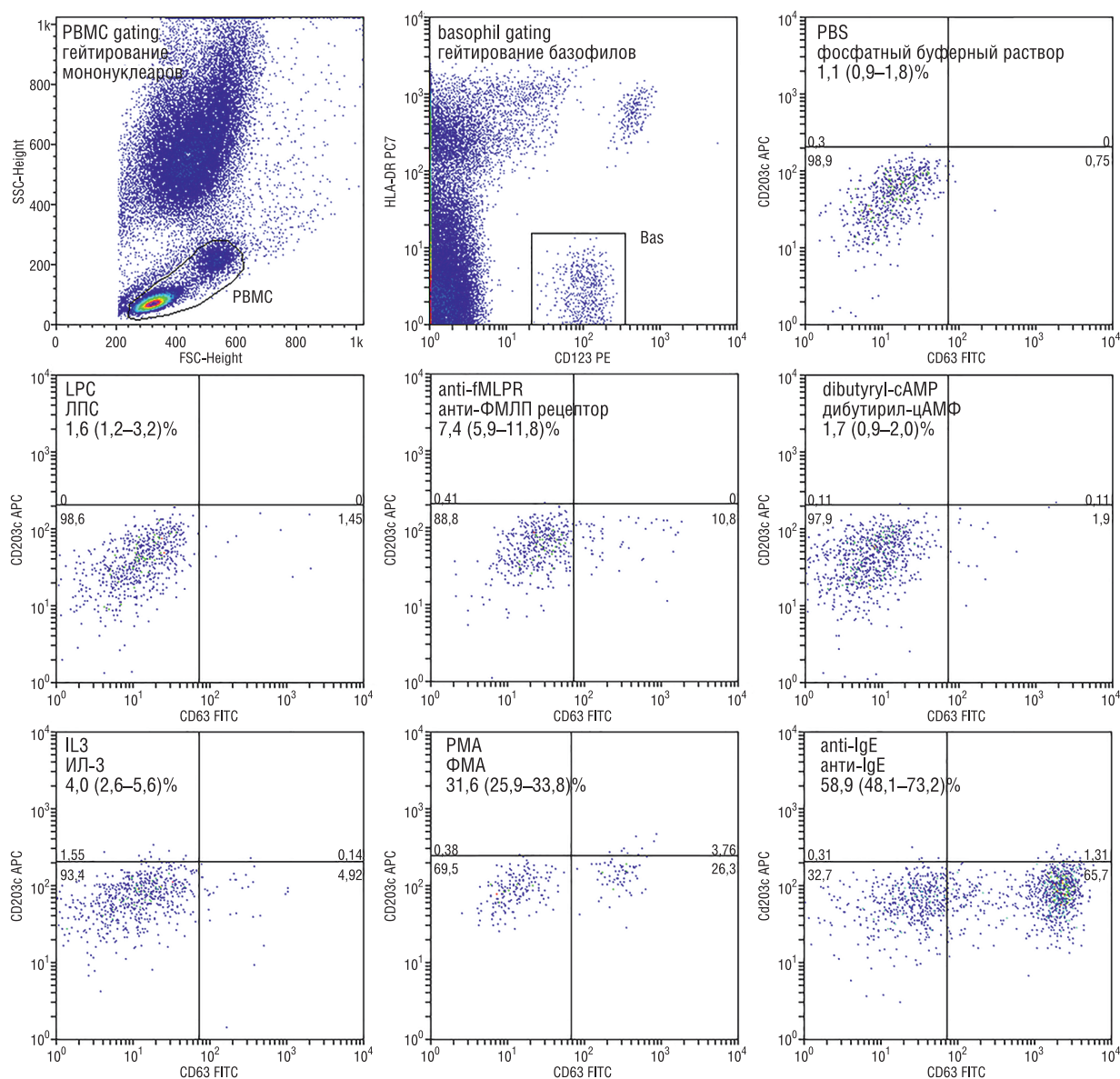


Рис. 1. Влияние различных веществ на активацию и дегрануляцию базофилов

Fig. 1. Effect of various substances on basophils activation and degranulation

раздражители опосредуются наличием множества рецепторов на поверхности клеток. Нами проведена оценка экспрессии ряда молекул, относящихся к разным функциональным классам, на поверхности неактивированных базофилов с целью выявления перспективных маркеров активации базофилов. Полученные показатели экспрессии молекул базофилами представлены в табл. 1. С целью оценки потенциала использования выбранных молекул в качестве маркеров активации и дегрануляции базофилов последние активировали моноклональным антителом к IgE. Степень изменения экспрессии молекул оценивали путем расчета индекса активации (ИА), представляющего собой соотношение значения экспрессии в положительном контроле к ее значению в отрицательном контроле. На рис. 2 наглядно представлена степень изменения экспрессии молекул CD63, CD107a, CD69, CD13, CD164, CD11b, CD300a и CD203c, достоверно усиливающуюся под действием IgE. Учитывая довольно высокий процент экспрессии некоторых молекул на базофилах в нативном состоянии, на рис. 2 представлен график, отражающий ИА маркеров.

Одной из ключевых функций базофилов является выброс вазоактивных веществ, содержащихся в многочисленных внутриклеточных гранулах базофилов, что в свою очередь обусловли-

Т а б л и ц а 1. Показатели экспрессии молекул на неактивированных базофилах
 T a b l e 1. The expression of molecules on non-activated basophils

Молекула	Функциональный класс	Показатель экспрессии, % (Me 25–75 %)	Индекс активации
CD11b	Интегрин альфа-M, рецептор к iC3b	94,1 (88,31–100,00)	1,71 (1,61–1,93)
CD11c	Интегрин альфа-X, рецептор для фибриногена	37,12 (33,53–43,57)	0,85 (0,31–1,64)
CD13	Аминопептидаза N	82,35 (76,40–94,37)	88,9 (81,2–100,00)
CD15	Молекула адгезии, Lewis X	6,47 (5,24–8,16)	0,67 (0,22–0,98)
CD16	Fc-гамма-RIII	14,30 (12,10–17,81)	0,34 (0,21–0,46)
CD32	Fc-гамма-RII	74,13 (70,00–77,39)	1,16 (1,00–1,95)
CD33	Молекула адгезии, рецептор к сиаловой кислоте	75,35 (62,32–82,38)	1,15 (0,64–1,23)
CD35	Рецептор к комплементу, CR1	88,70 (84,11–91,62)	1,17 (1,84–1,36)
CD40	Костимуляторный рецептор, надсемейство ФНО	11,18 (9,34–14,12)	0,30 (0,21–0,56)
CD43	Лейкосиалин (сиалофорин)	70,20 (61,35–79,11)	0,8 (0,58–1,10)
CD54	Молекула клеточной адгезии, ICAM-1	7,87 (5,48–9,10)	0,07 (0,04–0,11)
CD55	Фактор ускорения распада комплемента, DAF	93,12 (84,74–98,75)	1,06 (0,84–1,25)
CD62L	Молекула клеточной адгезии, L-селектин	90,64 (84,76–97,68)	1,10 (0,72–1,36)
CD63	LAMP-семейство, LAMP-3	1,46 (1,31–2,72)	41,4 (19,04–47,31)
CD68	LAMP-семейство	0,55 (0,15–1,14)	0,00
CD69	Семейство лектинов С типа	3,52 (2,80–4,86)	2,13 (1,34–2,60)
CD73	5'-эктонуклеотидаза	5,22 (4,57–7,33)	0,00
CD88	Рецептор к комплементу, C5AR1	0,59 (0,33–1,40)	1,46 (1,25–1,98)
CD95	Fas-рецептор (APO-1)	3,17 (2,46–5,24)	0,67 (0,44–0,78)
CD105	Эндоглин	3,85 (2,41–6,27)	1,00 (0,81–1,15)
CD106	Молекула клеточной адгезии, VCAM-1	0,73 (0,40–3,61)	1,48 (1,27–1,89)
CD107a	LAMP-семейство, LAMP-1	2,58 (1,86–6,45)	13,32 (6,54–26,40)
CD161	Семейство лектинов С типа, NKRP1	6,35 (4,33–7,98)	0,49 (0,27–1,11)
CD164	Молекула клеточной адгезии, эндолин	5,33 (3,00–6,45)	9,40 (8,42–13,73)
CD195	С-С рецептор хемокина 5 (CCR5)	5,15 (3,89–7,14)	0,51 (0,32–0,96)
CD197	С-С рецептор хемокина 5 (CCR5)	12,04 (9,76–14,38)	0,14 (0,00–0,33)
CD205	Рецептор эндоцитоза	2,01 (1,18–3,47)	1,00 (0,78–1,36)
CD282	Толл-подобный рецептор 2 (TLR2)	2,01 (1,40–3,15)	0,88 (0,63–1,12)
CD284	Толл-подобный рецептор 4 (TLR4)	1,56 (0,49–3,51)	1,12 (0,90–1,43)
CD300a	Ингибиторный рецептор	100	1,00

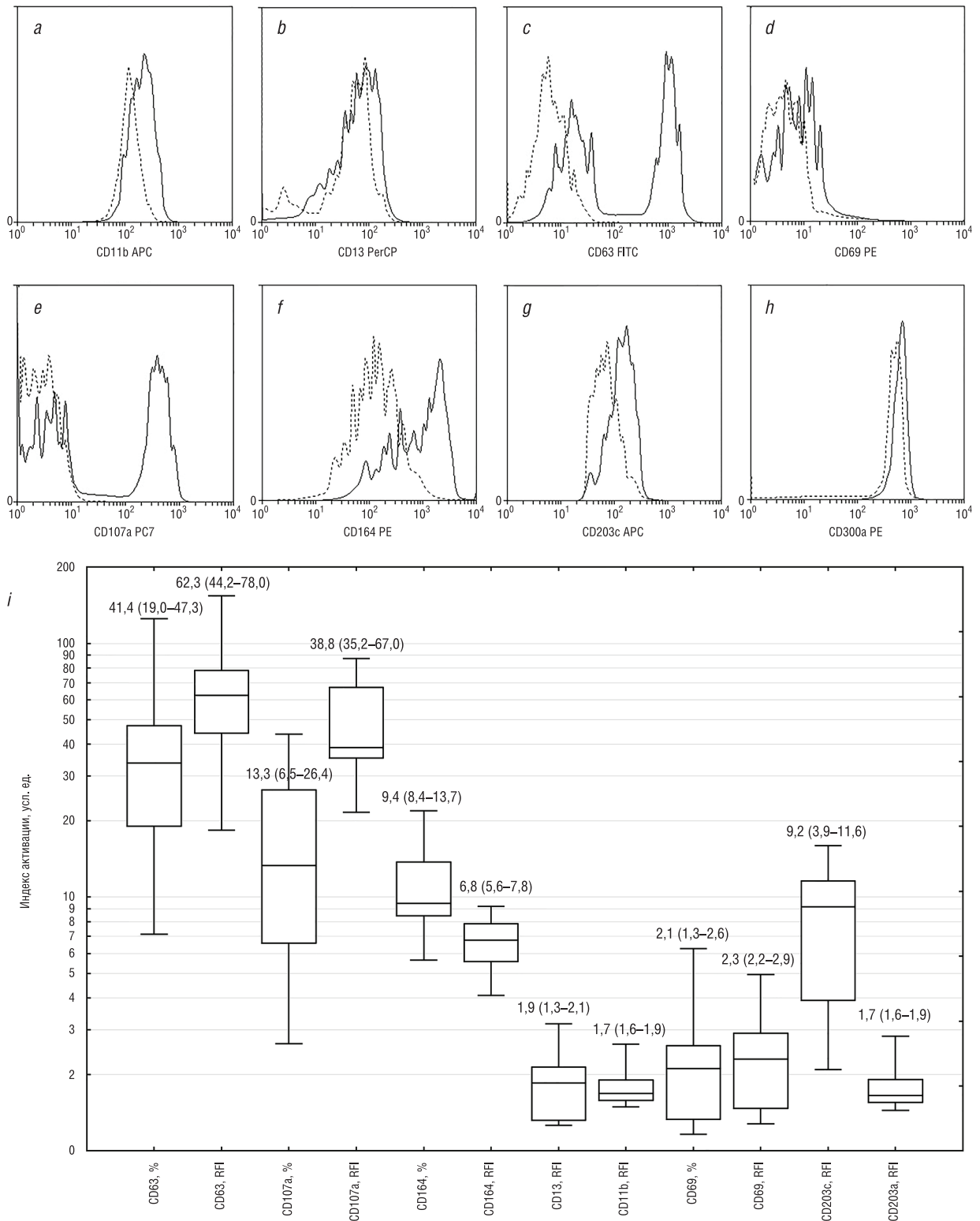


Рис. 2. Экспрессия молекул на базофилах под действием IgE: *a, b, c, d, e, f, g, h* – гистограммы маркеров активации базофилов CD11b, CD13, CD63, CD69, CD107a, CD164, CD203c, CD300a соответственно, где непрерывной линией обозначена экспрессия под влиянием IgE, пунктирной – отрицательный контроль; *i* – значения индекса активации молекул, усиливающих экспрессию на базофилах под влиянием IgE

Fig. 2. Expression of basophil molecules induced by the IgE activation: *a, b, c, d, e, f, g, h* – histograms of basophil activation markers CD11b, CD13, CD63, CD69, CD107a, CD164, CD203c, CD300a respectively. The continuous line indicates the expression by the IgE activation; the dotted line stands for the negative control; *i* – activation index for basophil molecules that enhance the expression on basophils due to the anti-IgE stimulation

вает развитие клинических симптомов аллергической реакции. На мембране лизосом базофилов экспрессируется ряд ассоциированных с лизосомами молекул (семейство LAMP): CD68, CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) и CD63 (LAMP-3). Наибольшее внимание было уделено двум молекулам – CD63 и CD107a, что обусловлено их невысоким содержанием на поверхности нативных базофилов и резким усилением их экспрессии после активации, что непосредственно отражает процесс дегрануляции базофилов. Установлено, что оба маркера дегрануляции базофилов (CD63 и CD107a), относящиеся в LAMP-семейству, характеризуются схожим характером экспрессии под действием IgE. К преимуществам использования этих молекул в качестве маркеров дегрануляции относится высокий индекс разделения популяций, превышающий в большинстве случаев 10 усл. ед. Это говорит о том, что дегранулировавшие базофилы можно корректно выделить на цитограммах флуоресценции (рис. 2).

Молекула CD203 экспрессируется на базофилах периферической крови, тучных клетках, а также их CD34⁺ предшественниках [18]. Несмотря на 100 %-ную экспрессию нативными базофилами, экспрессия молекулы CD203с на мембране клеток после специфической стимуляции аллергеном значительно возрастает [19]. Ряд исследователей указывают на более высокую чувствительность маркера CD203с в сравнении с использованием молекулы CD63 для диагностики аллергии на яды насекомых [20], кошачью шерсть [21] и амоксициллин [22]. Нами установлено достоверное повышение интенсивности экспрессии молекулы CD203с при активации базофилов ($p = 0,0002$).

Молекула CD164, помимо базофилов, экспрессируется преимущественно на гемопоэтических стволовых клетках (ГСК), и основной функцией этой молекулы считается угнетение пролиферации последних [23]. Роль молекулы в аллергических реакциях до конца не изучена, однако в ряде работ указывается на значимое усиление экспрессии при специфической активации базофилов [24]. Экспрессия на нативных базофилах довольно низкая (5,33 (3,00–6,45) %), при этом под воздействием анти-IgE значения экспрессии молекулы CD164 сопоставимы с ее значениями для маркера дегрануляции CD63 (51,5 (31,6–60,0) %).

Поверхностная молекула CD13, аминопептидаза N, присутствует на большинстве миелоидных клеток, включая базофилы. Результаты изучения эффективности использования данной молекулы в тесте активации базофилов представлены лишь в единичных работах, при этом при проведении данных исследований применялись лишь рекомбинантные аллергены [15, 25]. Нами установлено, что конститутивная экспрессия молекулы CD13 на неактивированных базофилах достаточно высокая (82,35 (76,40–94,37) %), следовательно, необходимо оценивать изменение ее интенсивности экспрессии в процессе активации базофилов.

Полученные данные по экспрессии молекулы CD11b, относящейся к семейству интегринов, представляют особый интерес, учитывая достоверное повышение интенсивности экспрессии при IgE-опосредованной активации базофилов. В литературе упоминается только одно исследование со схожими результатами [26]. Молекула CD69 первоначально была охарактеризована как ранний маркер активации лимфоцитов, после чего было показано, что CD69 определяется также на других активированных клетках, включая нейтрофилы, моноциты, эозинофилы. На неактивированных базофилах отмечается незначительная экспрессия данной молекулы, тогда как при активации наблюдается достоверное ее повышение, в том числе интенсивности экспрессии. Особый интерес представляет ингибиторный рецептор CD300a, который экспрессируется на большинстве миелоидных клеток, включая базофилы [27]. При активации последних наблюдается значительное усиление интенсивности экспрессии, однако место данной молекулы в диагностике реакций гиперчувствительности предстоит еще установить.

Согласно результатам проведенных экспериментов, наиболее перспективными для использования в лабораторной диагностике аллергии являются маркеры дегрануляции CD107a и CD63, а также маркеры активации CD164, CD13, CD11b, CD69, CD203с, CD300a. Несмотря на умеренное увеличение интенсивности экспрессии под влиянием активации базофилов, вышеперечисленные маркеры могут быть использованы для проведения ТАБ для усиления чувствительности и диагностической эффективности метода в целом (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Значения маркеров активации и дегрануляции базофилов в нативном и активированном состояниях

Table 2. Expression of activation and degranulation markers on native and activated basophils

Маркер	Отрицательный контроль		Положительный контроль		<i>p</i>	
	%	RFI	%	RFI	%	RFI
CD63	1,5 (1,3–2,7)	6,5 (3,7–9,6)	58,4 (49,6–64,3)	388,8 (243,5–521,4)	0,0002	0,0002
CD107a	2,6 (1,9–6,5)	3,9 (2,70–5,4)	42,1 (26,2–50,7)	164,1 (109,3–235,5)	0,0004	0,0002
CD164	5,3 (3,0–6,5)	47,6 (40,6–66,1)	51,5 (31,6–60,0)	347,0 (224,9–367,5)	0,0002	0,002
CD13	–	25,8 (19,8–30,1)	–	48,4 (32,9–59,1)	–	0,002
CD11b	–	23,8 (18,6–39,0)	–	51,7 (29,7–61,7)	–	0,007
CD69	3,5 (2,8–4,9)	3,71 (2,60–4,37)	7,3 (5,9–9,1)	8,7 (5,6–11,3)	0,009	0,0003
CD203c	–	4,0 (2,4–5,9)	–	27,0 (14,6–54,4)	–	0,0002
CD300a	–	230,1 (198,5–254,9)	–	396,1 (321,6–434,2)	–	0,0003

Заключение. В результате проведенного исследования нами оптимизированы условия постановки и учета теста активации базофилов для лабораторной диагностики IgE-опосредованной аллергии.

Показано, что сроки хранения образца периферической крови для постановки ТАБ не должны превышать 4 ч, а хранение и транспортировка должны осуществляться в условиях комнатной температуры (18–25 °С). В идеале постановка ТАБ должна выполняться непосредственно в том же учреждении, в котором осуществляется забор крови.

При изучении влияния различных иммунотропных веществ на базофилы с целью их дальнейшего использования в качестве неспецифического положительного контроля активации базофилов установлено, что ИЛ-3, дибутирил-цАМФ и ЛПС грамотрицательных бактерий обладают слабыми стимулирующими свойствами в отношении базофилов. Антитело к fMLPR вызывало умеренную активацию базофилов, но, тем не менее, недостаточную для использования в качестве положительного контроля. ФМА приводит к значительной активации клеток с увеличением интенсивности экспрессии CD203c и легко выявляемой дегрануляцией базофилов, определяемой по маркеру CD63. С целью оценки специфического ответа базофилов выбрано антитело к IgE. Таким образом, в качестве положительных контролей нами предлагается использовать ФМА в концентрации 2 нг/мл и антитело к IgE в концентрации 1 мкг/мл.

Скрининг молекул, экспрессируемых базофилами при воздействии антитела к IgE, с целью поиска потенциальных маркеров активации для постановки ТАБ показал, что оба маркера дегрануляции базофилов (CD63 и CD107a), относящиеся к LAMP-семейству, характеризуются схожим характером экспрессии под действием антитела к IgE. Такие молекулы, как CD11b, CD13, CD69, CD164 и CD300a, относящиеся к разным функциональным классам и усиливающие свою экспрессию с помощью базофилов под действием стимулов, могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров для усиления диагностической эффективности ТАБ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Sainte-Laudy, J. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis / J. Sainte-Laudy, C. Vallon, J.C. Guérin // *Allerg. Immunol. (Paris)*. – 1994. – Vol. 26, N 6. – P. 211–214.
2. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody / E. F. Knol [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1991. – Vol. 88, N 3, pt. 1. – P. 328–338.
3. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cell / M. J. Metzelaar [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, N 5. – P. 3239–3245.
4. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues / A. L. De Week [et al.] // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 18, N 3. – P. 143–155.
5. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: Characteristics and differences to CD63 upregulation / E. M. Sturm [et al.] // *Cytometry. Part B, Clin. Cytom.* – 2010. – Vol. 78, N 5. – P. 308–318.
6. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation / F. Hennersdorf [et al.] // *Cell Res.* – 2005. – Vol. 15, N 5. – P. 325–335.

7. Романова, И. В. Оптимизация алгоритма гейтирования базофилов на проточном цитометре: многоцветный анализ / И. В. Романова, А. Е. Гончаров, Н. И. Дударева // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. наук. – 2016. – №4. – С. 15–24.
8. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper / M. H. Shamji [et al.] // *Allergy*. – 2017. – Vol. 72, N 8. – P. 1156–1173.
9. Weasel for flow cytometry [Electronic resource] // Frank Battye – Flow Cytometry Consulting. – Mode of access: <http://www.frankbattye.com.au/Weasel/index.html>. – Date of access: 19.06.2016.
10. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2006. – 312 с.
11. A guide to modern statistical analysis of immunological data [Electronic resource] / B. Genser [et al.] // *BMC Immunol.* – 2007. – Vol. 8, N 27. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27>. – Date of access: 19.06.2016.
12. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation / E. M. Sturm [et al.] // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2010. – Vol. 78B, N 5. – P. 308–318.
13. Schroeder, J. T. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease / J. T. Schroeder, K. L. Chichester, A. P. Bieneman // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, N 4. – P. 2432–2438.
14. Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2 / A. de Paulis [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173, N 9. – P. 5739–5748.
15. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine / P. Filipazzi [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25, N 18. – P. 2546–2553.
16. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells / H. Kopf [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2007. – Vol. 7, N 13. – P. 1819–1824.
17. Flow-assisted allergy diagnosis: current application and future perspectives / D. G. Ebo [et al.] // *Allergy*. – 2006. – Vol. 61, N 9. – P. 1028–1039.
18. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 3 / H. J. Buhning [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 97. – P. 3303–3305.
19. Hymenoptera venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 3 in sensitized individuals / I. J. Platz [et al.] // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2001. – Vol. 126. – P. 335–342.
20. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy / B. Eberlein-König [et al.] // *Allergy*. – 2006. – Vol. 61, N 9. – P. 1084–1085.
21. Flow cytometry for basophil activation markers: The measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy / A. Ocmant [et al.] // *J. Immunol. Methods*. – 2007. – Vol. 320. – P. 40–48.
22. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy / N. Abuaf [et al.] // *Clin. Exp. Allergy*. – 2008. – Vol. 38, N 6. – P. 921–928.
23. The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis / A. C. Zannettino [et al.] // *Blood*. – 1998. – Vol. 92, N 8. – P. 2613–2628.
24. Wolanczyk-Medrała A. CD164 as a basophil activation marker / A. Wolanczyk-Medrała, W. Barg, W. Medrała // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – Vol. 17, N 34. – P. 3786–3796.
25. Recombinant allergens promote expression of aminopeptidase-n (CD13) on basophils in allergic patients / K. Sonneck [et al.] // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 21, N 1. – P. 11–21.
26. Bochner, B. S. Altered surface expression of CD11 and Leu 8 during human basophil degranulation. / B. S. Bochner, S. A. Sterbinsky // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 146, N 7. – P. 2367–2373.
27. Sabato, V. Human basophils express the inhibitory receptor CD300a (IRp60) / V. Sabato [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2011. – Vol. 127, N 2. – P. AB75.

References

1. Sainte-Laudy J., Vallon C., Guérin J. C. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allergie et Immunologie* (Paris), 1994, vol. 26, no. 6, pp. 211–214.
2. Knol E. F., Mul F. P., Jansen H., Calafat J., Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1991, vol. 88, no. 3, pt. 1, pp. 328–338. DOI: 10.1016/0091-6749(91)90094-5
3. Metzelaar M. J., Wijngaard P. L., Peters P. J., Sixma J. J., Nieuwenhuis H. K., Clevers H. C. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266, no. 5, pp. 3239–3245.
4. De Week, A. L., Sanz M. L., Gamboa P. M., Aberer W., Bienvenu J., Blanca M., Demoly P., Ebo D. G., Mayorga L., Monneret G., Sainte Laudy J. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2008, vol. 18, no. 3, pp. 143–155.
5. Sturm E. M., Kranzelbinder B., Heinemann A., Groselj-Strele A., Aberer W., Sturm G. J. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry Part B, Clinical Cytometry*, 2010, vol. 78, no. 5, pp. 308–318. DOI: 10.1002/cyto.b.20526

6. Hennersdorf F., Florian S., Jakob A., Baumgärtner K., Sonneck K., Nordheim A., Biedermann T., Valent P., Bühring H. J. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation. *Cell Research*, 2005, vol. 15, no. 5, pp. 325–335. DOI:10.1038/sj.cr.7290301
7. Ramanava I. U., Goncharov A. E., Dudareva N. I. Optimization of basophil gating algorithm on flow cytometry: multicolor analysis. *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2016, no. 4, pp. 15–24 (in Russian).
8. Shamji M. H., Kappen J. H., Akdis M., Jensen-Jarolim E., Knol E. F., Kleine-Tebbe J., Bohle B., Chaker A. M., Till S. J., Valenta R., Poulsen L. K., Calderon M. A., Demoly P., Pfaar O., Jacobsen L., Durham S. R., Schmidt-Weber C. B. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy*, 2017, vol. 72, no. 8, pp. 1156–1173. DOI: 10.1111/all.13138
9. Weasel for display and analysis of flow cytometry data. *Frank Battye – Flow Cytometry Consulting*. Available at: <http://www.frankbattye.com.au/Weasel/index.html> (accessed 19 June 2016).
10. Rebrova, O. Iu. Statistical analysis of medical data. Application of the Statistica software package. Moscow, MediaSfera Publ., 2006. 312 p. (in Russian).
11. Genser B., Cooper P. J., Yazdanbakhsh M., Barreto M. L., Rodrigues L. C. A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunology*, 2007, vol. 8, no. 27. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27> (accessed 19 June 2016).
12. Sturm E. M., Kranzelbinder B., Heinemann A., Groselj-Strele A., Aberer W., Sturm G. J. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2010, vol. 78, no. 5, pp. 308–318. DOI: 10.1002/cyto.b.20526
13. Schroeder J. T., Chichester K. L., Bieneman A. P. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *The Journal of Immunology*, 2009, vol. 182, no. 4, pp. 2432–2438. DOI: 10.4049/jimmunol.0801782
14. De Paulis A., Montuori N., Prevete N., Fiorentino I., Rossi F. W., Visconte V., Rossi G., Marone G., Ragno P. Urokinase induces chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2. *The Journal of Immunology*, 2004, vol. 173, no. 9, pp. 5739–5748.
15. Filipazzi P., Valenti R., Huber V., Pilla L., Canese P., Iero M., Castelli C., Mariani L., Parmiani G., Rivoltini L. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, vol. 25, no. 18, pp. 2546–2553.
16. Kopf H., de la Rosa G. M., Howard O. M., Chen X. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. *International Immunopharmacology*, 2007, vol. 7, no. 13, pp. 1819–1824. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.08.027
17. Ebo D. G., Sainte-Laudy J., Bridts C. H., Mertens C. H., Hagendorens M. M., Schuerwegh A. J., De Clerck L. S., Stevens W. J. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy*, 2006, vol. 61, no. 9, pp. 1028–1039.
18. Bühring H. J., Seiffert M., Giesert C., Marxer A., Kanz L., Valent P., Sano K. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood*, 2001, vol. 97, no. 10, pp. 3303–3305.
19. Platz I. J., Binder M., Marxer A., Lischka G., Valent P., Bühring H. J. Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2001, vol. 126, pp. 335–342. DOI: 10.1159/000049531
20. Eberlein-König B., Varga R., Mempel M., Darsow U., Behrendt H., Ring J. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy*, 2006, vol. 61, no. 9, pp. 1084–1085. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01122.x
21. Ocmant A., Peignois Y., Mulier S., Hanssens L., Michils A., Schandené L. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *Journal of Immunological Methods*, 2007, vol. 320, pp. 40–48. DOI: 10.1016/j.jim.2006.12.002
22. Abuaf N., Rostane H., Rajoely B., Gaouar H., Autegarden J.E., Leynadier F., Girot R. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, 2008, vol. 38, no. 6, pp. 921–928. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.02960.x
23. Zannettino A. C., Bühring H. J., Niutta S., Watt S. M., Benton M. A., Simmons P. J. The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. *Blood*, 1998, vol. 92, no. 8, pp. 2613–2628.
24. Wolanczyk-Medrała A., Barg W., Medrała W. CD164 as a basophil activation marker. *Current Pharmaceutical Design*, 2011, vol. 17, no. 34, pp. 3786–3796.
25. Sonneck K., Baumgartner C., Rebuzzi L., Marth K., Chen K. W., Hauswirth A. W., Florian S., Vrtala S., Bühring H. J., Valenta R., Valent P. Recombinant allergens promote expression of aminopeptidase-n (CD13) on basophils in allergic patients. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2008, vol. 21, no. 1, pp. 11–21. DOI: 10.1177/039463200802100103
26. Bochner B. S., Sterbinsky S. A. Altered surface expression of CD11 and Leu 8 during human basophil degranulation. *The Journal of Immunology*, 1991, vol. 146, no. 7, pp. 2367–2373.
27. Sabato V., Verweij M., Bridts C., De Clerck L., Stevens W., Schiavino D., Ebo D. Human basophils express the inhibitory receptor CD300a (IRp60). *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011, vol. 127, no. 2, p. AB75. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.12.310

Информация об авторах

Романова Ирина Владимировна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: romanovairavlad@gmail.com.

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com.

Дударева Наталья Ивановна – канд. мед. наук, заведующий отделением. 10-я городская клиническая больница (ул. Уборевича, 73, 220096, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lpul0gkb@rambler.ru.

Information about the authors

Iryna U. Ramanava – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23 Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: romanovairavlad@gmail.com.

Andrei Y. Hancharou – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com.

Natalia I. Dudarava – Ph. D. (Med.), Head of the Department. 10th City Clinical Hospital (73, Uborevich Str., 220096, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lpul0gkb@rambler.ru.

Е. С. Смирнова, Е. А. Григоренко, Н. П. Митьковская

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

СТРЕССОВАЯ ГИПЕРГЛИКЕМИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КРУПНООЧАГОВЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Аннотация. Изучены особенности течения острого крупноочагового инфаркта миокарда (ИМ), осложненного развитием стрессовой гипергликемии (ГГ), у 185 пациентов без нарушений углеводного обмена в анамнезе.

В ходе исследования у лиц со стрессовой ГГ установлена бо́льшая выраженность системного воспаления, нарушений гемостаза и изменений гормонального статуса на фоне более тяжелого течения ИМ и более выраженных изменений структурно-функциональных параметров сердечно-сосудистой системы. Выявлены особенности течения ИМ и изменения показателей гомеостаза в зависимости от динамики уровня гликемии в остром периоде заболевания. Разработана математическая модель, позволяющая оценить риск развития сахарного диабета II типа в постинфарктном периоде.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, стрессовая гипергликемия

Для цитирования: Смирнова, Е. С. Стрессовая гипергликемия у пациентов с острым крупноочаговым инфарктом миокарда / Е. С. Смирнова, Е. А. Григоренко, Н. П. Митьковская // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2017. – № 4. – С. 60–69.

E. S. Smirnova, E. A. Grigorenko, N. P. Mitkovskaya

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

STRESS-INDUCED HYPERGLYCEMIA IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

Abstract. The objective of the present research was to reveal the features of acute myocardial infarction in patients without violations of carbohydrate metabolism in the anamnesis complicated by the development of hyperglycemia and to create a mathematical model for assessment of the development of Diabetes Mellitus 2 types in the post-myocardial infarction period.

Results for examination of 185 patients with acute large-focal myocardial infarction (MI) without previous carbohydrate metabolism disorders are presented in the article. Patients with MI and hyperglycemia (HG) were characterized by more severe systemic inflammation, hemostasis disturbances and changes in the hormonal state than patients without HG. This was associated with more severe MI progression and more prominent changes in structural and functional cardiovascular parameters. The changes in patient outcomes and homeostasis parameters have been revealed depending on the dynamics of glycemia in the acute period of MI. We have developed a mathematical model for assessment of diabetes mellitus onset risks in patients with MI and HG.

Keywords: myocardial infarction, hyperglycemia

For citation: Smirnova E. S., Grigorenko E. A., Mitkovskaya N. P. Stress-Induced hyperglycemia in patients with acute myocardial infarction. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 60–69 (in Russian).

Введение. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) во всем мире является лидирующей причиной летальных исходов, причем уровень заболеваемости данной патологией имеет тенденцию к неуклонному росту. В настоящее время в Европе ежегодно причиной летальных исходов в 1,8 млн случаев является ИБС. По данным национальных регистров стран, входящих в Европейское общество кардиологов, госпитальная летальность от острого инфаркта миокарда (ИМ) с подъемом сегмента ST составляет от 4 до 12 % [1]. При этом развитие стрессовой гипергликемии (ГГ) у пациентов с ИМ значительно увеличивает риск неблагоприятных исходов и является независимым прогностическим фактором увеличения летальности в раннем и отдаленном постинфарктных периодах [2–5]. В настоящее время изучение патофизиологических механизмов, обуславливающих неблагоприятный прогноз, у пациентов с ИМ и ГГ, а также поиск оптимальной тактики ведения данной категории лиц имеют не только научно-практическую значимость, но и достаточ-

но востребованы. Особый интерес представляет оценка вероятности развития сахарного диабета (СД) II типа у пациентов с острым ИМ, осложненным развитием ГГ.

Цель исследования – выявить особенности течения острого крупноочагового инфаркта миокарда, осложненного развитием стрессовой гипергликемии, у пациентов без нарушений углеводного обмена в анамнезе и разработать математическую модель прогнозирования развития сахарного диабета II типа в постинфарктном периоде.

Материалы и методы исследования. В клиническое исследование были включены 185 пациентов с острым крупноочаговым ИМ, поступивших в отделения интенсивной терапии и реанимации городских клинических больниц г. Минска. ИМ диагностировали на основании клинических, электрокардиографических и биохимических критериев, разработанных специалистами Американской коллегии кардиологов и Европейского общества кардиологов, стрессовую ГГ – в соответствии с рекомендациями Американской коллегии кардиологов при выявлении у поступивших в первые сутки после ИМ уровня глюкозы крови 8,0 ммоль/л и более [2]. В зависимости от развития ГГ были сформированы две группы пациентов. В основную группу были включены 106 лиц с ИМ и ГГ, в группу сравнения – 79 пациентов с ИМ без ГГ.

Критериями исключения пациентов из исследования являлись: ИМ и нарушения углеводного обмена в анамнезе, некоронарогенные заболевания миокарда, перенесенное кардиохирургическое или интервенционное вмешательство, острые инфекционные заболевания и обострение хронических воспалительных заболеваний, прогрессирующие заболевания печени и почек, онкологическая патология, последствия термических и химических ожогов, диссеминированное внутрисосудистое свертывание, аутоиммунные болезни, иммунодефициты, наличие трансплантированных органов и тканей, послеоперационная гипoinsулинемия, витамин- B_{12} -дефицитная анемия.

Для оценки структурно-функционального состояния сердечно-сосудистой системы использовали следующие инструментальные методы: электрокардиографическое исследование (ЭКГ) (выполняли на электрокардиографе «ИНТЕКАРД-3», Беларусь); эхокардиографическое исследование (с использованием аппарата MindrayM7 (Китай) в трех режимах – М-, В-модальном и цветном доплеровском); селективную рентгенконтрастную коронароангиографию (проводили в рентгеноперационных, оснащенных цифровой ангиографической установкой).

Лабораторные методы исследования включали определение уровня кардиоспецифических ферментов. Концентрацию Тропонина I определяли с использованием набора для количественной экспресс-диагностики кардиомаркеров Triage (Biosite Diagnostics, Inc.), креатинфосфокиназы (КФК) и КФК-МВ – с помощью автоматического биохимического анализатора Konelab 30i производства Termo Electron Corporation (Финляндия). Уровень глюкозы крови оценивали высокоспецифичным гексокиназным методом с использованием коммерческих наборов GLUCOSE «E-D» (Россия). Уровень гликированного гемоглобина определяли методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов Glycohemoglobin HbA-test фирмы Human. Для исследования концентрации интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), кортизола, лептина, инсулина, С-пептида, суммарного количества нитратов и нитритов (NO_3/NO_2) применяли наборы фирмы DRG International, Inc. (США), используя метод ELISA. Концентрацию Д-димера определяли с помощью метода иммуноферментного анализа, используя набор TECHNOZYMD-Dimer фирмы Technoclone GmbH (Австрия). Уровень фибриногена оценивали по методу Клаусса.

Обработку полученных данных осуществляли с помощью статистических пакетов программ Excel, Statistica (версия 10.0, StatSoft, Inc., США), SPSS (версия 16.0, SPSS Incorporation, США). Для определения количественных признаков оценивали параметры распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Сравнение двух независимых групп по количественному признаку, имеющему нормальное распределение, проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента, в случае несоответствия распределения признака закону нормального распределения в исследуемых группах применяли критерий Манна–Уитни. При сравнении независимых выборок по качественным признакам оценивали различия между группами с применением точного критерия Фишера, теста χ^2 . Различия в группах считали значимыми при вероятности безошибочного прогноза 95,5 % ($p < 0,05$). Для выявления взаимосвязи двух признаков выполняли корреляционный анализ. С целью определения предикторов развития СД II типа проведен регрессионный анализ методом логистической регрессии с включением в модель наиболее значимых и информативных

признаков, а также выполнен ROC-анализ для оценки качества полученной математической модели. Рассчитана мощность предложенного метода для оценки работоспособности модели.

Исследуемые группы достоверно не различались по возрастному и половому составу, распространенности факторов сердечно-сосудистого риска у пациентов. Удельный вес куривших среди пациентов группы с ИМ и ГГ составил 54,7 % ($n = 58$) и статистически значимо не отличался от данного показателя в группе пациентов с ИМ без ГГ (51,9 % ($n = 41$)). Частота встречаемости артериальной гипертензии у лиц основной группы составила 90,6 % ($n = 96$) и достоверно не отличалась от таковой в группе пациентов с ИМ без ГГ (86,1 % ($n = 68$)). Семейный анамнез ранней ИБС выявлен у 21 (19,8 %) пациента с ИМ и ГГ, что соответствовало частоте встречаемости данного фактора в группе лиц с ИМ без ГГ (15,2 % ($n = 12$)). Значение индекса массы тела в группе пациентов с ИМ и ГГ составило 27,7 (26,0–30,0) кг/м² и достоверно не отличалось от соответствующего показателя в группе сравнения (27,0 (25,1–29,0) кг/м²).

Результаты и их обсуждение. У лиц с крупноочаговым ИМ при отсутствии нарушений углеводного обмена в анамнезе (удельный вес пациентов с ГГ составил 57,3 % ($n = 106$)) установлена высокая распространенность стрессовой ГГ, неблагоприятная прогностическая значимость которой доказана в отношении краткосрочного и долгосрочного прогноза [2–6]. Частота развития СД II типа у пациентов с острым ИМ, осложненным развитием ГГ, в течение года наблюдения составила 29,6 %.

В основе патогенеза ИМ с подъемом сегмента ST лежит последовательность патологических процессов, включающих дестабилизацию, разрыв или изъятие атеросклеротической бляшки, которые индуцируют активизацию тромбоцитарного и плазменного гемостаза и приводят к формированию окклюзирующего тромбоза коронарной артерии [7, 8]. В результате проведения с помощью электрокардиографии топической диагностики ИМ в группе пациентов с ИМ и ГГ установлена большая доля лиц с локализацией поражения в переднеперегородочной, верхушечной области левого желудочка, чем в группе пациентов с ИМ без ГГ (17,0 % ($n = 18$) против 6,3 % ($n = 5$); $\chi^2 = 4,7$, $p < 0,05$), что ассоциируется с неблагоприятным прогнозом [9].

Установлено, что максимально быстрое достижение реперфузии ограничивает распространение зоны некротического поражения, приводит к снижению частоты развития осложнений и летальности у пациентов с ИМ, поэтому восстановление кровотока в инфаркт-связанной артерии является основной задачей организационной и лечебной тактики [1, 7]. В настоящее время

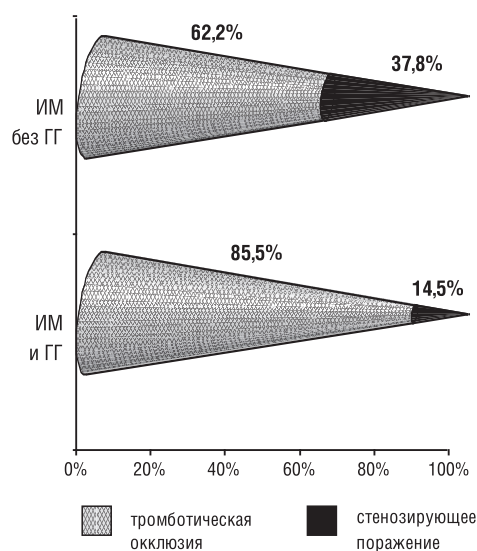


Рис. 1. Структура исследуемых групп в зависимости от вида поражения инфаркт-связанной артерии у пациентов

Fig. 1. Structure of test groups depending on the type of complication of the artery infarction of patients

общепризнана приоритетная роль первичного чрескожного коронарного вмешательства в реперфузии у пациентов с ИМ с подъемом сегмента ST [10]. При изучении распределения обследуемых в зависимости от бассейна локализации инфаркт-связанной коронарной артерии в группе пациентов с ИМ и ГГ установлен статистически значимо более высокий удельный вес лиц с локализацией инфаркт-связанной коронарной артерии в бассейне левой коронарной артерии, чем в группе пациентов с ИМ без ГГ (70,9 % ($n = 39$) и 44,4 % ($n = 20$); $\chi^2 = 7,2$, $p < 0,01$), что создает предпосылки для более выраженного нарушения перфузии миокарда в группе лиц с ИМ и ГГ [11]. Анализ вида поражения инфаркт-связанной коронарной артерии в группе пациентов с ИМ и ГГ выявил более высокий удельный вес лиц с тромботическим окклюзирующим поражением инфаркт-связанной артерии по данным коронароангиограмм, чем в группе пациентов с ИМ без ГГ (рис. 1), что ассоциировалось с ухудшением течения и прогноза ИМ [12].

Анализ локализации окклюзирующего поражения инфаркт-связанной артерии в группе пациентов с ИМ и ГГ по сравнению с группой лиц с ИМ без ГГ пока-

зал статистически значимо более высокий удельный вес пациентов с поражением 1-го сегмента передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии (34,0 % ($n = 16$) и 3,6 % ($n = 1$); $\chi^2 = 9,3, p < 0,01$) и достоверно более низкий удельный вес пациентов с поражением 1-го (14,9 % ($n = 7$) и 46,4 % ($n = 13$); $\chi^2 = 8,9, p < 0,01$) и 2-го (2,1 % ($n = 1$) и 21,4 % ($n = 6$); $\chi^2 = 7,7, p < 0,01$) сегментов правой коронарной артерии, что указывает на повышение риска краткосрочных и отдаленных неблагоприятных исходов в группе пациентов с ИМ и ГГ при использовании в качестве конечных точек таких показателей, как летальность от сердечно-сосудистых причин и частота госпитализаций по поводу сердечной недостаточности [13].

Сравнительный анализ результатов эхокардиографии показал, что в группе пациентов с ИМ и ГГ по сравнению с группой лиц с ИМ без ГГ имеются структурно-функциональные особенности повреждения миокарда, которые свидетельствуют о более выраженных процессах раннего постинфарктного ремоделирования у пациентов с ИМ без нарушений углеводного обмена в анамнезе при развитии стрессовой ГГ и ассоциируются с неблагоприятным прогнозом, повышая риск летального исхода и развития осложнений в группе лиц с ИМ и ГГ [7, 14–17]. Так, в группе пациентов с ИМ и ГГ выявлена бóльшая выраженность процессов дилатации левого желудочка, чем в группе лиц с ИМ без ГГ (конечно-систолический размер $3,9 \pm 0,10$ и $3,6 \pm 0,06$ см, $p < 0,05$; удельный вес пациентов, у которых выявлено увеличение размеров левого желудочка в диастолу (конечно-диастолический размер более 5,3 см для лиц женского пола и более 5,9 см для лиц мужского пола): 28,8 % ($n = 15$) и 10,0 % ($n = 3$); $\chi^2 = 3,9, p < 0,05$).

В группе пациентов с ИМ и ГГ выявлены бóльшая частота развития систолической дисфункции левого желудочка, чем в группе сравнения, и более выраженные изменения показателей, отражающих систолическую функцию левого желудочка (фракция выброса (ФВ): 53,5 % (47,0–56,0) и 58,0 % (55,0–65,0), $p < 0,001$; конечно-систолический объем: 68 (52–88) и 49 (40–56) мл, $p < 0,05$; конечно-систолический индекс: $37,2 \pm 2,94$ и $27,4 \pm 2,13$ мл/м², $p < 0,05$).

У пациентов с ИМ одновременно с изменением структурно-геометрических параметров левого желудочка наблюдались функциональные нарушения, лежащие в основе развития локальной сократительной дисфункции. Установлена более высокая частота выявления и бóльшая выраженность нарушения локальной сократимости миокарда в группе пациентов с ИМ и ГГ по сравнению с группой лиц с ИМ без ГГ, что отражалось в более высоких значениях индекса локальной сократимости (рис. 2) и суммарной сократимости пораженных сегментов (10 (8–16) и 5 (4–8) баллов, $p < 0,001$).

Индекс нарушения локальной сократимости является важным прогностическим фактором и позволяет выделить группу пациентов с высоким риском неблагоприятного исхода, а также лиц с высоким риском развития тяжелых нарушений гемодинамики в остром периоде ИМ [18]. Наличие зон локальной дисфункции миокарда приводит к снижению насосной функции левого желудочка в целом [14].

В группе пациентов с ИМ и ГГ установлен высокий удельный вес лиц (50,0 %) с осложненным течением в первые сутки заболевания (в группе сравнения – 26,6 %; $\chi^2 = 10,3, p < 0,01$). Клиническая картина ИМ у пациентов с ГГ по сравнению с группой пациентов с ИМ без ГГ характеризовалась бóльшей

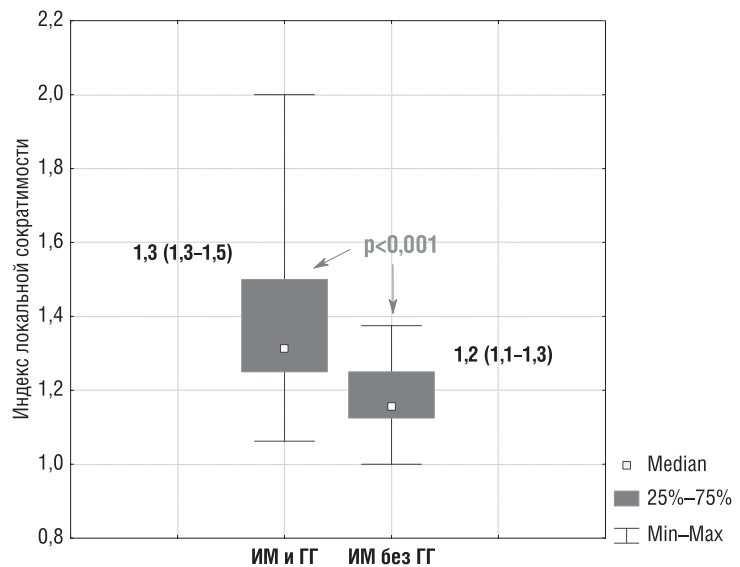


Рис. 2. Значения индекса локальной сократимости левого желудочка у пациентов исследуемых групп

Fig. 2. Regional contractility indices of the left ventricle of test group patients

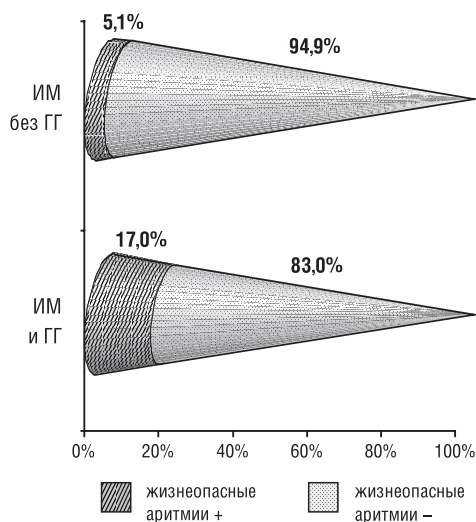


Рис. 3. Структура исследуемых групп в зависимости от наличия у пациентов жизнеопасных аритмий

Fig. 3. Test group structure depending on the presence of life-threatening arrhythmia of patients

частотой встречаемости высоких классов острой сердечной недостаточности по классификации Killip (II класс: 32,1 % ($n = 34$) и 17,7 % ($n = 14$), $\chi^2 = 4,9$, $p < 0,05$; III класс: 7,5 % ($n = 8$) и 1,3 % ($n = 1$), $\chi^2 = 3,9$, $p < 0,05$), что ассоциировалось с увеличением летальности и частоты развития неблагоприятных коронарных событий [19]. В группе пациентов с ИМ и ГГ установлено статистически значимо более частое развитие жизнеопасных аритмий, чем у лиц с ИМ без ГГ (рис. 3), выявлена достоверно более высокая частота развития нарушений ритма с доказанным неблагоприятным прогностическим влиянием – фибрилляции желудочков (10,4 % ($n = 11$), 2,5 % ($n = 2$); $\chi^2 = 4,3$, $p < 0,05$).

В настоящее время установлена ключевая роль активации воспаления в развитии атеросклеротического процесса и его наиболее грозного проявления – ИМ. В свою очередь развитие ИМ сопровождается выраженной провоспалительной активацией. По результатам проведенных исследований установлено повышение концентрации воспалительных маркеров в циркулирующей крови у пациентов с ИМ, при этом у лиц с ИМ и СД в анамнезе наблюдались более высокие уровни провоспалительных цитокинов, чем у пациентов без СД II типа [20, 21]. При этом, согласно результатам исследований, проведенных *in vitro*, на животных и в человеческой популяции, стрессовая ГГ может приводить к более выраженному оксидативному сдвигу, чем хроническая длительная ГГ.

Оксидативный стресс в свою очередь может являться индуктором для процессов воспаления, а впоследствии и инсулинорезистентности, что может способствовать повышению уровня гликемии. Для пациентов с ИМ и ГГ по сравнению с группой лиц с ИМ без ГГ была характерна более выраженная активация провоспалительных цитокинов, что проявлялось достоверно более высокими значениями интерлейкина-6 (2,6 (1,6–5,0) и 0,8 (0,4–1,4) пг/мл; $p < 0,001$), фактора некроза опухоли- α (7,5 (2,6–20,3) и 3,0 (0,7–7,3) пг/мл; $p < 0,05$). Активация данных цитокинов ассоциируется, по литературным данным, с повышением летальности, развитием рецидива и повторного ИМ, нестабильной стенокардией, сердечной недостаточностью и нарушениями сердечного ритма в постинфарктном периоде [22, 23].

В группе пациентов с ИМ и ГГ установлены более высокие значения суммарного количества нитратов и нитритов (27,4 (21,0–31,0) и 19,8 (13,3–22,1) мкмоль/л; $p < 0,05$), что ассоциируется с активацией прооксидантных показателей и может рассматриваться в качестве фактора, ухудшающего течение ИМ [24].

Уровни интерлейкина-6 характеризовались наличием прямой корреляционной взаимосвязи умеренной силы со значениями суммарного количества нитратов и нитритов ($r = 0,32$, $p < 0,05$), лептина ($r = 0,34$, $p < 0,05$), инсулина ($r = 0,33$, $p < 0,05$), фибриногена ($r = 0,31$, $p < 0,05$), Д-димеров плазмы крови ($r = 0,45$, $p < 0,001$), сывороточной концентрации КФК ($r = 0,34$, $p < 0,05$). Для показателей фактора некроза опухоли- α установлена прямая корреляционная взаимосвязь умеренной силы со значениями суммарного количества нитратов и нитритов ($r = 0,49$, $p < 0,001$), лептина ($r = 0,39$, $p < 0,05$), инсулина ($r = 0,38$, $p < 0,01$), фибриногена ($r = 0,29$, $p < 0,05$) и Д-димеров плазмы крови ($r = 0,32$, $p < 0,05$). Выявленные корреляционные взаимосвязи свидетельствовали о вовлечении активации провоспалительных цитокинов, характерной для пациентов с ИМ и ГГ, в формирование инсулинорезистентности и усиление гемокоагуляционных нарушений.

Установлена прямая корреляционная взаимосвязь умеренной силы уровней интерлейкина-6 со значениями индекса локальной сократимости левого желудочка ($r = 0,36$, $p < 0,05$), суммарной сократимостью пораженных сегментов ($r = 0,35$, $p < 0,05$) и с наличием тромботического окклюзирующего поражения инфаркт-связанной артерии по данным коронароангиографии

($r = 0,44, p < 0,05$). Для значенняў фактара некроза опухолі- α ўстаноўлена наяўнасць адваротнай карэляцыйнай звязі умереннай сілы са значэннямі ФВ ($r = -0,33, p < 0,05$). Таксама адзначалася наяўнасць прамой звязі умереннай сілы са значэннямі канечнага систолическага памеру левага желудочка ($r = 0,32, p < 0,05$), канечнага систолическага аб'ёму левага желудочка ($r = 0,46, p < 0,05$), індэкса лакальнай сократымасці ($r = 0,45, p < 0,01$) і суммарнай сократымасцю паражаных сегментаў ($r = 0,46, p < 0,01$). Узровень суммарнага колькасця нітратў і нітритў характарызаваўся наяўнасцю адваротнай карэляцыйнай звязі умереннай сілы са значэннямі ФВ ($r = -0,33, p < 0,05$), наяўнасцю прамой звязі умереннай сілы з індэксам лакальнай сократымасці ($r = 0,53, p < 0,001$) і суммарнай сократымасцю паражаных сегментаў міокарда левага желудочка ($r = 0,53, p < 0,001$).

В групе пацыентаў з ІМ і ГГ ўстаноўлены больш высокія значэння сывороточнай канцэнтрацыі інсуліна (30,4 (23,4–43,4) і 12,4 (8,2–20,0) $\mu\text{IU/ml}$; $p < 0,001$) на фоне больш высокага удельнага вага пацыентаў з прэвышэннем пароговых значэнняў інсуліна, чым у лід з ІМ без ГГ, што можа яўляцца косвенным сведчэнствам больш выражанай інсулінорэзістэнтнасці у пацыентаў з ІМ і ГГ, а выяўленыя асаблівасці гармональнага статусу асацыююцца з павелічэннем летальнасці і развіццём неблагопрыятных сэрцачна-сасудзістых падзеяў у пацыентаў з ІМ [18, 22, 24]. Устаноўлена наяўнасць адваротнай карэляцыйнай звязі умереннай сілы між узрнем інсуліна і значэннямі ФВ ($r = -0,32, p < 0,05$). Таксама выяўлена наяўнасць прамой звязі умереннай сілы са значэннямі канечнага систолическага памеру ($r = 0,33, p < 0,05$), канечна-систолическага аб'ёму ($r = 0,47, p < 0,05$), індэкса лакальнай сократымасці ($r = 0,29, p < 0,05$), суммарнай сократымасці паражаных сегментаў міокарда левага желудочка ($r = 0,28, p < 0,05$) і наяўнасцю тромбацічнага акулзуючага паражэння інфаркт-звязанай артэрыі па даным каронараангіаграфіі пры выкананні пераважнага чрэскожнага каронарнага ўмяшчальства ($r = 0,32, p < 0,05$).

Д-димеры яўляюцца прадуктам дэградацыі папярэчна-сшытага фібрына плазміном. Іх узровень адражае актывацыю фібрынолізу, якому прадшэствае ўзмацненне коагуляцыйнага каскада з ізбыточным афармаваннем нерастворимага фібрына, што характарызуе інтэнсіўнасць внутрысасудзістай гемакогуляцыі [17]. Выяўлены больш высокія узрні Д-димераў у групе пацыентаў з ІМ і ГГ па сраўненню з групой лід з ІМ без ГГ (1421,0 (431,0–1422,0) і 281,2 (78,5–498,8) нг/мл ; $p < 0,001$). Пры гэтым усе больш шырока іспользуецца вызначэнне узрня Д-димераў у якасці прадіктара летальнасці у пацыентаў у крытычных стаяніях. Імеючыся сведчэння ўказваюць на наяўнасць звязі між узрнем Д-димераў у пацыентаў, поступіўшых у аддзяленні інтэнсіўнай тэрапіі і рэанімацыі, са значэннямі па шкале АРАСНЕ ІІ (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) і SAPS (Simplified Acute Physiology Score) [16]. Устаноўлена, што павышэнне узрня Д-димераў у пацыентаў з острым каронарным сіндромам асацыююцца з павелічэннем рыска летальнасці, з рыскам развіцця нестабільнай стэнокардыі, паўторнага ІМ і інсульту [6, 22]. Па рэзультатам ісследования ўстаноўлены адваротная карэляцыйная звязь умереннай сілы між канцэнтрацыяй Д-димераў і значэннямі ФВ ($r = -0,32, p < 0,05$), а таксама прамая умеренная звязь з індэксам лакальнай сократымасці ($r = 0,38, p < 0,05$) і суммарнай сократымасцю паражаных сегментаў міокарда левага желудочка ($r = 0,37, p < 0,05$).

Устаноўлены больш высокія узрні фібрыногена ў групе пацыентаў з ІМ і ГГ па сраўненню з групой лід з ІМ без ГГ (4,1 (3,5–5,0) і 3,5 (3,0–4,2) г/л ; $p < 0,001$). У цяперашняе час доказана неблагопрыятная прагностычная значнасць павышэння узрня фібрыногена у пацыентаў з ІМ [14, 24].

Група пацыентаў з ІМ і ГГ характарызаваўся схільнасцю к больш высокім узрням біяхімічных маркераў некроза міокарда, што нашло сваё адражэнне ў больш высокіх значэннях плазменнаяй канцэнтрацыі КФК (1656 (914–2870) Ед/л пратыв 423 (205–1001) Ед/л саответствэнна; $p < 0,001$), МВ-фракцыі КФК (188 (80–312) Ед/л пратыв 44 (26–114) Ед/л ; $p < 0,001$) (188 (80–312) Ед/л пратыв 44 (26–114) Ед/л ; $p < 0,001$) і тропоніна І (10,1 (1,7–29,9) нг/мл пратыв 1,7 (0,4–5,1) нг/мл ; $p < 0,001$). Ступень павышэння ўказаных паказатэляў мае прамую звязь з наступным развіццём асложненняў ІМ і павелічэннем летальнасці [9, 22].

ИМ у пациентов с ГГ протекал на фоне более высоких значений кортизолемии, чем у лиц с ИМ без ГГ (657,5 (580,0–800,0) и 330,0 (232,0–620,0 нг/мл; $p < 0,001$), что указывает на большую выраженность процессов нейрогормональной активации в остром периоде заболевания у пациентов с ИМ и ГГ, является прогностическим неблагоприятным фактором в отношении летальности и тяжести заболевания, обладает положительной корреляцией со шкалой АРАСНЕ II и является предиктором развития дезадаптивного постинфарктного ремоделирования [19, 20]. По результатам нашего исследования установлено наличие обратной корреляционной взаимосвязи умеренной силы между концентрацией кортизола и значениями ФВ ($r = -0,39$, $p < 0,05$), выявлено наличие прямой умеренной взаимосвязи с индексом локальной сократимости ($r = 0,37$, $p < 0,05$) и суммарной сократимостью пораженных сегментов левого желудочка ($r = 0,37$, $p < 0,05$).

Для пациентов с ИМ и ГГ были характерны более высокие значения лептинемии, чем для лиц с ИМ без ГГ (10,3 (5,7–26,9) и 4,7 (3,5–11,5) нг/мл; $p < 0,05$), что ассоциируется с неблагоприятным прогнозом [21]. Спектр гормонального воздействия лептина включает его неблагоприятное влияние на эндогенный фибринолиз, функцию эндотелия, агрегацию тромбоцитов, инсулинорезистентность, протромботические механизмы, сократимость и ремоделирование миокарда, а также на активацию симпатического отдела вегетативной нервной системы [13, 22, 23]. Установлена обратная корреляционная взаимосвязь умеренной силы между концентрацией лептина и значениями ФВ ($r = -0,40$, $p < 0,05$), выявлена прямая взаимосвязь умеренной силы со значениями индекса локальной сократимости ($r = 0,39$, $p < 0,05$) и суммарной сократимостью пораженных сегментов миокарда левого желудочка ($r = 0,38$, $p < 0,05$).

Высокая летальность у пациентов с СД II типа, госпитализированных с острым коронарным синдромом, установлена во многих исследованиях и составляет 7–18 % в первые 30 дней, 15–34 % в течение 1 года и около 43 % в течение 5 лет. При этом частота повторного ИМ, инсульта и смерти в течение 1 года у лиц, перенесших острый ИМ, сопоставима с таковой в группах пациентов с впервые выявленным СД II типа и при наличии данного заболевания в анамнезе [18, 24]. В связи с этим актуальным и практически значимым представляется оценка вероятности развития СД II типа у пациентов с острым ИМ, осложненным развитием стрессовой ГГ.

С целью выделения предикторов развития СД у пациентов с острым ИМ, осложненным развитием стрессовой ГГ, выполнен регрессионный анализ полученных данных. В качестве группирующей переменной принят категориальный показатель «развитие сахарного диабета», принимающий два возможных значения – «да» или «нет». Для нахождения наиболее существенных предикторов использовали метод последовательного исключения переменных, т. е. из двух моделей, адекватность которых отличается незначительно, следует предпочесть модель с меньшим числом переменных. В качестве критерия сравнения моделей использовали информационный критерий Акаике (AIC). Кроме того, для проверки гипотезы о различии двух моделей применяли критерий χ^2 . Таким образом, на каждом шаге из модели исключали одну переменную, в результате чего новая модель имела меньшее значение критерия AIC и критерий χ^2 отвергал гипотезу о различии моделей.

Регрессионный анализ с использованием метода последовательного исключения переменных позволил построить итоговую адекватную модель ($\chi^2 = 30,559$, $p = 0,0000 < 0,05$) для прогнозирования развития СД II типа, включавшую при значении AIC = 24,55 и всех значимых коэффициентах признаки: «уровень С-пептида», «уровень фактора некроза опухоли- α », «значение индекса массы тела». Таким образом, в результате проведенного регрессионного анализа выделены следующие предикторы развития СД II типа у пациентов с острым ИМ и ГГ: уровень фактора некроза опухоли- α , уровень С-пептида, значение индекса массы тела. Разработана математическая модель, позволяющая определить риск развития СД II типа у данной категории пациентов. Оценка риска развития СД II типа у пациентов с ИМ, осложненным развитием ГГ, не имеющих нарушений углеводного обмена в анамнезе, производится путем расчета интегрального показателя, характеризующего вероятность развития СД II типа у данной категории пациентов, по формуле

$$Y = \frac{1}{1 + \exp(-b_0 - b_1 X_1 - b_2 X_2 - b_3 X_3)},$$

где переменные $b_0 = -24,1346$, $b_1 = 1,0733$, $b_2 = 0,4672$, $b_3 = 0,6286$; X_1 – уровень С-пептида, нг/мл; X_2 – уровень фактора некроза опухоли- α , пг/мл; X_3 – значение индекса массы тела, кг/м².

Интерпретация результатов вычисления вероятности развития СД II типа у пациентов с ИМ и стрессовой ГГ следующая: при расчетном значении $Y > 0,601$ формула позволяет прогнозировать высокий риск СД II типа, при $Y < 0,601$ – низкий. Процент верной классификации – 94,3 %, что свидетельствует о хорошей предсказательной способности предложенной модели.

Заключение. Развитие стрессовой ГГ у пациентов с острым крупноочаговым ИМ, не имеющих нарушений углеводного обмена в анамнезе, сопровождается увеличением удельного веса лиц с осложненным течением заболевания, более частым развитием жизнеопасных аритмий (устойчивая желудочковая тахикардия, асистолия, полная атриовентрикулярная блокада), высокой частотой выявления фибрилляции желудочков, большей долей лиц с высокими классами острой сердечной недостаточности по классификации Killip.

В группе пациентов с крупноочаговым ИМ и стрессовой ГГ по сравнению с группой лиц с ИМ без ГГ установлен более высокий удельный вес пациентов с локализацией инфаркт-связанной артерии в бассейне левой коронарной артерии и тромботическим окклюзирующим поражением инфаркт-связанной артерии с кровотоком ТИМІ 0, что ассоциировалось с высокими уровнями интерлейкина-6 и инсулина. Выявлена большая частота тромботического поражения первого сегмента передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии и более высокая частота встречаемости очага поражения в передне-перегородочной и верхушечной областях левого желудочка по данным электрокардиографии.

Раннее ремоделирование левого желудочка у пациентов со стрессовой ГГ и крупноочаговым ИМ без нарушений углеводного обмена в анамнезе характеризовалось большими значениями конечно-систолического размера и удельного веса пациентов, увеличением конечно-диастолического размера левого желудочка и большей выраженностью его систолической дисфункции, а также более выраженным нарушением локальной сократимости миокарда, что ассоциировалось с более высокими уровнями гликемии, интерлейкина-6, фактора некроза опухоли- α , Д-димеров, лептина, кортизола, инсулина, суммарного количества нитратов и нитритов.

Предикторами развития СД II типа у пациентов с острым крупноочаговым ИМ, осложненным развитием стрессовой ГГ, являются: уровни фактора некроза опухоли- α и С-пептида, значение индекса массы тела. Разработана математическая модель, позволяющая прогнозировать развитие СД II типа у данной категории пациентов в постинфарктный период.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The task force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC) / В. Ibanez [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2017. – ehx637.
2. Hyperglycemia and acute coronary syndrome. A scientific statement from the american heart association diabetes committee of the council on nutrition, physical activity, and metabolism / P. Deedwania [et al.] // *Circulation.* – 2008. – Vol. 117, N 12. – P. 1610–1619.
3. Предикторы неблагоприятных исходов чрескожных коронарных вмешательств у пациентов с острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST / Н. П. Митьковская [и др.] // *Мед. панорама.* – 2012. – №4. – С. 3–5.
4. Интервенционная кардиология. Коронарная ангиография и стентирование : практ. рук. / А. П. Савченко [и др.]. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 448 с.
5. Шахнович, Р. М. Острый коронарный синдром с подъемом сегмента ST : рук. для врачей / Р. М. Шахнович. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 376 с.
6. Normal flow (TIMI-3) before mechanical reperfusion therapy is an independent determinant of survival in acute myocardial infarction: analysis from the primary angioplasty in myocardial infarction trials / G. Stone [et al.] // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104, N 6. – P. 636–641.
7. Cardiovascular mortality and heart failure risk score for patients after ST-segment elevation acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention (data from the leiden mission infarct registry) / M. L. Antoni [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2012. – Vol. 109, N 2. – P. 187–194.
8. Нечесова, Т. А. Ремоделирование левого желудочка: патогенез и методы оценки / Т. А. Нечесова, И. Ю. Коробко, Н. И. Кузнецова // *Мед. новости.* – 2008. – №11. – С. 7–13.
9. Хайрутдинова, Г. Диагностические критерии ремоделирования левого желудочка у больных после перенесенного инфаркта миокарда с зубцом Q / Г. Хайрутдинова, А. Галявич // *Практ. медицина.* – 2011. – №4. – С. 75–79.

10. Cardiovascular mortality and heart failure risk score for patients after ST-segment elevation acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention (data from the leiden mission infarct registry) / M. L. Antoni [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2012. – Vol. 109, N 2. – P. 187–194.
11. Оранский, П. Уровни цитокинов у больных Q-позитивным инфарктом миокарда в сыворотке крови и культурах мононуклеаров крови / П. Оранский, Р. Ханферян // *Цитокины и воспаление.* – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 31–33.
12. Inflammatory responses after percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction or stable angina pectoris / S. Solheim [et al.] // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2008. – Vol. 68, N 7. – P. 555–562.
13. Ceriello, A. Cardiovascular effects of acute hyperglycaemia: pathophysiological underpinnings / A. Ceriello // *Diab. Vasc. Dis. Res.* – 2008. – Vol. 5, N 4. – P. 260–268.
14. Использование биомаркеров-цитокинов в диагностике и прогнозировании течения инфаркта миокарда / М. В. Зыков [и др.] ; КемГМА Минздравсоцразвития, Ин-т комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний ; под общ. ред. М. В. Зыкова. – Кемерово, 2012. – 24 с.
15. Значение определения нитритов-нитратов как маркеров дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистой патологии / Л. А. Лапшина [и др.] // *Укр. мед. часоп.* – 2009. – № 6. – С. 49–53.
16. Hyperinsulinemia is a predictor of new cardiovascular events in Colombian patients with a first myocardial infarction / R. Garcia [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2011. – Vol. 148, N 1. – P. 85–90.
17. Прогностическое значение повышенного уровня D-димера плазмы крови у больных острым коронарным синдромом / Панина А. В. [и др.] // *Bull. of Med. Internet Conf.* – 2013. – Vol. 3, N 6. – P. 954.
18. Лечебная тактика у пациентов с крупноочаговым инфарктом миокарда и гипергликемией с позиций кардиопротекции / Н. П. Митьковская [и др.] // *Мед. панорама.* – 2012. – № 4. – С. 17–19.
19. Aldosterone and cortisol predict medium-term left ventricular remodelling following myocardial infarction / A. Robin [et al.] // *Eur. J. Heart Fail.* – 2011. – Vol. 13, N 12. – P. 1305–1313.
20. Hormonal supplementation in endocrine dysfunction in critically ill patients / A. Dulawa [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2007. – Vol. 59, N 2. – P. 139–149.
21. Wallander, M. Leptin: a predictor of abnormal glucose tolerance and prognosis in patients with myocardial infarction and without previously known Type 2 diabetes / M. Wallander, S. Soderberg, A. Norhammar // *Diabet. Med.* – 2008. – Vol. 25, N 8. – P. 949–955.
22. Митьковская, Н. П. Сердце и метаболический риск / Н. П. Митьковская, Е. А. Григоренко, Л. И. Данилова. – Минск : Белорус. наука, 2008. – 277 с.
23. Pallan, S. Effects and mechanisms of action of leptin on cardiomyocytes [Electronic resource] / S. Pallan // *J. of Young Investigators.* – 2004. – N 2. – Mode of access: <http://www.jyi.org/issue/effects-and-mechanisms-of-action-of-leptin-on-cardiomyocytes.html>. – Date of access: 05.05.2016.
24. Прогностическое значение и возможности коррекции гипергликемии у пациентов с острым коронарным синдромом / В. С. Моисеев [и др.] // *Клин. фармакология и терапия.* – 2008. – № 2. – С. 65–73.

References

1. Ibanez B., James S., Agewall S., Antunes M. J., Bucciarelli-Ducci C., Bueno H., Caforio A. L. P., Crea F., Goudevanos J. A., Halvorsen S., Hindricks G., Kastrati A., Lenzen M. J., Prescott E., Roffi M., Valgimigli M., Varenhorst C., Vranckx P., Widimský P. ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The task force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 2017, ehx637. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx637
2. Deedwania P., Kosiborod M., Barrett E., Ceriello A., Isley W., Mazzone T., Raskin P. hyperglycemia and acute coronary syndrome. A scientific statement from the american heart association diabetes committee of the council on nutrition, physical activity, and metabolism. *Circulation*, 2008, vol. 117, no. 12, pp. 1610–1619.
3. Mit'kovskaya N. P., Abel'skaya I. S., Postoyalko A. S., Statkevich T. V., Galitskaya S. S., Smirnova E. S., Balysh E. M., Samoliuk B. B. Predictors of adverse outcomes of percutaneous coronary interventions in patients with acute myocardial infarction with segment elevation ST. *Medit'sinskaya panorama* [Medical Panorama], 2012, no. 4, pp. 3–5 (in Russian).
4. Savchenko A. P., Cherkavskaja O. V., Rudenko B. A., Bolotov P. A. *Interventional cardiology. Coronary angiography and stenting: practical guide*. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2010. 448 p. (in Russian).
5. Shakhnovich R. M. *Acute coronary syndrome with ST segment elevation: guide for doctors*. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2010. 376 p. (in Russian).
6. Stone G. W., Cox D., Garcia E., Brodie B. R., Morice M. C., Griffin J., Mattos L., Lansky A. J., O'Neill W. W., Grines C. L. Normal flow (TIMI-3) before mechanical reperfusion therapy is an independent determinant of survival in acute myocardial infarction: analysis from the primary angioplasty in myocardial infarction trials. *Circulation*, 2001, vol. 104, no. 6, pp. 636–641.
7. Antoni M. L., Hoogslag G. E., Boden H., Liem S. S., Boersma E., Fox K., Schaliij M. J., Bax J. J., Delgado V. Cardiovascular mortality and heart failure risk score for patients after ST-segment elevation acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention (data from the leiden mission infarct registry). *American Journal of Cardiology*, 2012, vol. 109, no. 2, pp. 187–194.
8. Nechesova T. A., Korobko I. Yu., Kuznetsova N. I. Remodeling of the left ventricle: pathogenesis and evaluation methods. *Medit'sinskie novosti* [Medical News], 2008, no. 11, pp. 7–13 (in Russian).
9. Khairutdinova G., Galiavich A. Diagnostic criteria for left ventricular remodeling in patients after a previous myocardial infarction with a merlon. *Prakticheskaya meditsina* [Practical Medicine], 2011, no. 4, pp. 75–79 (in Russian).

10. Antoni M. L., Hoogslag G. E., Boden H., Liem S. S., Boersma E., Fox K., Schali J. M. J., Bax J. J., Delgado V. Cardiovascular mortality and heart failure risk score for patients after ST-segment elevation acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention (data from the leiden mission infarct registry). *American Journal of Cardiology*, 2012, vol. 109, no. 2, pp. 187–194. DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.08.029
11. Oranskii P., Khanferian R. Cytokine levels in patients with Q-positive myocardial infarction in serum and cultures of blood mononuclear cells. *Tsitokiny i vospalenie* [Cytokines and Inflammation], 2009, vol. 8, no. 2, pp. 31–33 (in Russian). DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.08.029
12. Solheim S., Grøgaard H. K., Hoffmann P., Arnesen H., Seljeflot I. Inflammatory responses after percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction or stable angina pectoris. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2008, vol. 68, no. 7, pp. 555–562.
13. Ceriello A. Cardiovascular effects of acute hyperglycaemia: pathophysiological underpinnings. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 2008, vol. 5, no. 4, pp. 260–268. DOI: 10.3132/dvdr.2008.038
14. Zykov M. V., Barbarash O. L., Karetnikova V. N., Kashtalov V. V. The use of biomarkers-cytokines in the diagnosis and prediction of the course of myocardial infarction. *Kemerevo*, 2012. 24 p. (in Russian).
15. Lapshina L. A., Kravchun P. G., Titova A. Y., Glebova O. V. The value of the determination of nitrites-nitrates as markers of endothelial dysfunction in cardiovascular disease. *Ukrain's'kyj medychnyj chasopys* [Ukrainian Medical Journal], 2009, no. 6, pp. 49–53 (in Russian).
16. García R. G., Rincón M. Y., Arenas W. D., Silva S. Y., Reyes L. M., Ruiz S. L., Ramirez F., Camacho P. A., Luengas C., Saaibi J. F., Balestrini S., Morillo C., López-Jaramillo P. Hyperinsulinemia is a predictor of new cardiovascular events in Colombian patients with a first myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 2011, vol. 148, no. 1, pp. 85–90. DOI: 10.1016/j.ijcard.2009.10.030
17. Panina A. V., Dovgalevskii Ya. P., Furman N. V., Puchinyan N. F., Bogomolova O. S. Prognostic value of elevated plasma D-dimer level in patients with acute coronary syndrome. *Bulletin of Medical Internet Conferences*, 2013, vol. 3, no. 6, p. 954 (in Russian).
18. Mit'kovskaya N. P., Statkevich T. V., Smirnova E. S., Balysh E. M., Galitskaya S. S., Cherviakov T. A., Troianova N. V., Kulazhenko I. O. Therapeutic tactics in patients with large-focal myocardial infarction and hyperglycaemia in terms of cardioprotection. *Meditsinskaya panorama* [Medical Panorama], 2012, no. 3, pp. 17–19 (in Russian).
19. Weir R. A., Tzorlalis I. K., Steedman T., Dargie H. J., Fraser R., McMurray J. J., Connell J. M. Aldosterone and cortisol predict medium-term left ventricular remodelling following myocardial infarction. *European Journal of Heart Fail*, 2011, vol. 13, no. 12, pp. 1305–1313. DOI: 10.1093/eurjhf/hfr129
20. Duława A., Bułdak Ł., Krysiak R., Okopień B. Hormonal supplementation in endocrine dysfunction in critically ill patients. *Pharmacological Reports*, 2007, vol. 59, no. 2, pp. 139–149.
21. Wallander M., Soderberg S., Norhammar A. Leptin: a predictor of abnormal glucose tolerance and prognosis in patients with myocardial infarction and without previously known Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 2008, vol. 25, no. 8, pp. 949–955. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2008.02509.x
22. Mit'kovskaya N. P., Grigorenko E. A., Danilova L. I. *Heart and metabolic risk*. Minsk, Belorusskaya nauka Publ., 2008. 277 p. (in Russian).
23. Pallan S. Effects and mechanisms of action of leptin on cardiomyocytes [Electronic resource]. *Journal of Young Investigators*, 2004, no. 2. Available at: <http://www.jyi.org/issue/effects-and-mechanisms-of-action-of-leptin-on-cardiomyocytes.html> (accessed 05.05.2016).
24. Moiseev V. S., Mil'to A. S., Pavlikova E. P., Tolkacheva V. V. Prognostic value and the possibility of correction of hyperglycemia in patients with acute coronary syndrome. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya* [Clinical Pharmacology and Therapy], 2008, no. 2, pp. 65–73 (in Russian).

Информация об авторах

Смирнова Елена Сергеевна – ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alena.sergeevna.smirnova@gmail.com.

Григоренко Елена Александровна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alegri@tut.by.

Митковская Наталья Павловна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mitkovskaya1@mail.ru.

Information about the authors

Elena S. Smirnova – Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alena.sergeevna.smirnova@gmail.com.

Elena A. Grigorenko – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alegri@tut.by.

Natalia P. Mitkovskaya – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mitkovskaya1@mail.ru.

Л. В. Янковская, В. А. Снежицкий, С. А. Ляликов, Т. Л. Степура

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМОВ *BsmI* И *FokI* ГЕНА *VDR* И СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА D

Аннотация. Целью исследования было сравнить уровни липидов плазмы крови при разных генотипах полиморфных маркеров *BsmI* (B/b) (rs1544410) и *FokI* (F/f) (rs2228570) гена рецептора витамина D (*VDR*) с учетом D-витаминного статуса лиц с ишемической болезнью сердца (ИБС).

Проведено обследование 97 пациентов (43 мужчин, 54 женщин) с ИБС. Определение полиморфизмов *BsmI* и *FokI* гена *VDR* проводили методом полимеразной цепной реакции. Содержание витамина D (25(OH)D) в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа. Уровни общего холестерина (ОХ), липопротеидов высокой (ЛПВП) и низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов (ТГ) оценивали колориметрическим, ферментативным методом.

Показано, что уровень 25(OH)D в крови ниже 30 нг/мл был у 93 % обследованных. При наличии аллеля b в полиморфизме *BsmI* гена *VDR* уровни ОХ и ТГ были достоверно ниже ($p = 0,001$), чем при генотипе BB. При генотипах bb или Bb в сочетании с Ff или ff уровень ОХ в плазме крови был наименьшим по сравнению с таковым при других генотипах полиморфных маркеров *BsmI* и *FokI* гена *VDR*. При генотипах bb или bB в сочетании с FF уровень ЛПВП выше ($p = 0,048$), чем при генотипе bb или bB в сочетании с Ff или ff. При наличии аллеля B в полиморфизме *BsmI* гена *VDR* риск гиперхолестеринемии был в 4,3 раза выше, чем у лиц с генотипом bb (ОШ = 4,3; 95 % ДИ 1,3; 14,1).

Таким образом, установлено, что у лиц с ИБС и D-гиповитаминозом полиморфизм *BsmI* и *FokI* гена *VDR* влияет на уровни ОХ и ТГ, а наличие аллеля B при полиморфизме *BsmI* повышает риск гиперхолестеринемии.

Ключевые слова: полиморфизм гена *VDR*, *BsmI*, *FokI*, витамин D, ишемическая болезнь сердца

Для цитирования: Липидный профиль у пациентов с ишемической болезнью сердца в зависимости от полиморфизмов *BsmI* и *FokI* гена *VDR* и содержания витамина D / Л. В. Янковская [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2017. – № 4. – С. 70–76.

L. Yankouskaya, V. Snezhitskiy, S. Lyalikov, T. Stepuro

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

LIPID PROFILE IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE DEPENDING ON *BsmI* AND *FokI* POLYMORPHISMS OF THE *VDR* GENE AND THE VITAMIN D CONTENT

Abstract. The objective of the study was to compare the level of plasma lipids in different genotypes of the polymorphic markers *BsmI* (B/b) (rs1544410) and *FokI* (F/f) (rs2228570) of the vitamin D receptor gene (*VDR*) taking into account the D vitamin content in persons with coronary heart disease (CHD).

97 patients (43 men, 54 women) with CHD were examined. The *BsmI* and *FokI* polymorphisms of *VDR* genes were determined by the polymerase chain reaction. Concentration of vitamin D (25(OH)D) in blood plasma was determined by enzyme immunoassay. A total cholesterol level (TCh), high-density (HDL) and low-density lipoprotein (LDL), triglycerides (TG) were assessed by the colorimetric, enzymatic method.

A level of 25(OH)D blood below 30 ng/ml was found in 93 % of the examined persons. In the presence of the allele B in the *BsmI* polymorphism of the *VDR* gene, the levels of TCh and TG are significantly lower ($p = 0.001$) than in the genotype BB. With genotypes bb or Bb in combination with Ff or ff, the level of TCh in the blood plasma is smallest in comparison to other genotypes of polymorphic markers *BsmI* and *FokI* of the *VDR* gene. With genotype bb or bB in combination with FF, the level of HDL is higher ($p = 0.048$) than in the genotype bb or bB in combination with Ff or ff. In the presence of the allele B in the polymorphism of the *VDR* gene, the *BsmI* risk of hypercholesterolemia is 4.3 times higher than in individuals with the genotype bb (OR = 4.3, 95 % CI 1.3; 14.1).

In individuals with CHD and D-hypovitaminosis, the *BsmI* and *FokI* polymorphisms of the *VDR* genes affect the level of TCh and TG and the presence of the allele B with the *BsmI* polymorphism increases the risk of hypercholesterolemia.

Keywords: polymorphism of *VDR* gene, *BsmI*, *FokI*, vitamin D, coronary heart disease

For citation: Yankouskaya L., Snezhitskiy V., Lyalikov S., Stepuro T. Lipid profile in patients with ischemic heart disease depending on *BsmI* and *FokI* polymorphisms of the *VDR* gene and the vitamin D content. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 70–76 (in Russian).

Введение. В ряде опубликованных к настоящему времени работ указывается на взаимосвязь между содержанием витамина D и уровнем липидов в плазме крови [1–5]. Установлена прямая корреляционная взаимосвязь уровня 25-гидрокси-витамина D (25(OH)D) с содержанием липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и apoA1, отрицательная взаимосвязь с содержанием липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов (ТГ) и коэффициентом атерогенности (КА) [1, 4, 6]. Высокие уровни 25(OH)D обуславливают снижение уровней ТГ и индекса ЛПНП/ЛПВП [3]. Результаты исследования с проведением коронарографии показали, что уровень 25(OH)D имел обратную корреляционную взаимосвязь с уровнями общего холестерина ($p = 0,002$), ЛПНП ($p < 0,001$) и ТГ ($p = 0,01$), а наличие дефицита витамина D опосредованно, через нарушения липидного обмена, определяло повышенный риск развития ишемической болезни сердца (ИБС) (OR = 1,32, $p = 0,004$) и ее тяжелого течения (OR = 1,18; $p = 0,05$) [2]. Однако мета-анализ 12 рандомизированных контролируемых исследований, посвященных влиянию на липиды плазмы препаратов витамина D при их дополнительном приеме, показал достоверное повышение содержания ЛПНП [7]. Вместе с тем по результатам мета-анализов трудно определить, какую роль играет уровень 25(OH)D в плазме крови по сравнению с другими важными факторами сердечно-сосудистого риска, которые сами могут влиять не только на исходный уровень, но и на динамику 25(OH)D в плазме крови при восполнении его дефицита.

В исследовании *in vitro* было показано прямое влияние активного метаболита витамина D – 1,25-дигидрокси-витамина D (1,25(OH)₂D) посредством активации рецепторов витамина D (VDR) на поглощение ЛПНП макрофагами [8]. У лиц с диабетом в среде, содержащей витамин D, макрофаги подавляли образование пенистых клеток путем снижения поглощения ЛПНП. Когда VDR в макрофагах были удалены, ЛПНП вызывали ускоренное формирование пенистых клеток. Так, 1,25(OH)₂D, активируя VDR, играет ключевую роль в снижении поглощения ЛПНП макрофагами и, соответственно, в развитии атеросклероза у лиц с сахарным диабетом. Кроме того, регуляция витамином D синтеза ЛПВП может быть обусловлена модуляцией VDR экспрессии гена аполипопротеида A1 в гепатоцитах и энтероцитах [9]. Таким образом, сигнальный путь через VDR может лечь в основу еще одной теории развития атеросклероза в организме.

На сегодняшний день очень мало работ, посвященных анализу генетического полиморфизма VDR у лиц с ИБС и оценке липидного спектра крови и D-витаминного статуса.

Цель исследования – сравнить уровень липидов плазмы крови при разных генотипах полиморфных маркеров *BsmI* (B/b) (rs1544410) и *FokI* (F/f) (rs2228570) гена VDR с учетом D-витаминного статуса у лиц с ишемической болезнью сердца.

Материалы и методы исследования. Проведено обследование 97 пациентов (43 мужчин, 54 женщин) с ИБС в возрасте от 35 до 79 лет (в среднем $63,4 \pm 8,2$ года). Постинфарктный кардиосклероз был у 49 (50,5 %) обследованных. На кафедру поликлинической терапии пациентов направляли врачи терапевты и кардиологи городских поликлиник № 1–6 г. Гродно по мере обращаемости и при подписании информированного согласия при их соответствии критериям включения/исключения из исследования. Протокол исследования был одобрен комитетом по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (ГрГМУ). Критериями включения в исследование были пациенты с ИБС: стабильной стенокардией напряжения и/или постинфарктным кардиосклерозом, в том числе в сочетании с эссенциальной артериальной гипертензией (АГ) II степени. Критериями исключения из исследования были: нестабильная стенокардия, хроническая сердечная недостаточность выше II функционального класса (NYHA), хроническая почечная недостаточность, сахарный диабет, наличие заболеваний, приводящих к вторичной АГ (эндокринных, почечных и т. д.), прием глюкокортикостероидов, саркоидоз, активная форма туберкулеза легких, онкопатология и другие тяжелые сопутствующие заболевания, которые могли бы повлиять на исследуемые параметры.

Всем обследованным выполняли общий анализ крови и мочи, а также анализы на содержание сахара в крови (натощак), мочевины, креатинина. Результаты во всех случаях соответствовали норме. Забор крови из вены производился утром натощак, через 12–14 ч после последнего приема пищи и лекарств. Всем обследуемым выполняли электрокардиографию, измеряли офисное артериальное давление (АД). Медиана значений систолического и диастолического давления (САД/ДАД) составила 140,0 (130,0; 150,0)/90,0 (80,0; 90,0) мм рт. ст.

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной венозной крови осуществляли с помощью набора реагентов «ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ» («Литех», Россия) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Определение полиморфного варианта *BsmI* (B/b) (rs1544410) гена *VDR* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией результата, применяя соответствующий набор реагентов («Литех», Россия). Для амплификации исследуемого локуса ДНК использовали термоциклер Applied Biosystems 2720. Разделение продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 3 %-ном агарозном геле, приготовленном на ТАЕ-буфере и окрашенном Zubr green. Для визуализации и регистрации ПЦР-продуктов применяли систему гель-документирования Gel Doc XR + Imaging System.

Выявление полиморфного варианта *FokI* (F/f) (rs2228570) гена *VDR* проводили методом анализа полиморфизма длины фрагментов, полученных в ходе рестрикции продукта ПЦР. Для амплификации указанного фрагмента использовали набор реагентов для приготовления реакционной смеси («Синтол», Россия) и синтетические олигонуклеотиды производства «Праймтех» (Беларусь): *VDR-Fok-F* 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCTCT-3' и *VDR-Fok-R* 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'. Реакционную смесь готовили исходя из расчета на одну пробу: 10 мкл 2,5×реакционной смеси, содержащей 2,5×ПЦР-буфер (KCl, TrisHCl (pH = 8,8), 6,25 мМ MgCl₂), *SynTaq* ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20, 1 мкл раствора MgCl₂ (25 мМ), 1 мкл каждого праймера (10 мМ), 5 мкл образца ДНК, 7 мкл деионизированной воды ПЦР-качества. Процесс рестрикции полученных ампликонов проводили согласно инструкции с помощью набора реагентов Jena Bioscience GmbH (Германия). Для разделения продуктов рестрикции применяли метод горизонтального электрофореза в 2 %-ном агарозном геле, приготовленном на ТАЕ-буфере и окрашенном Zubr green, для визуализации и регистрации полученного результата – систему гель-документирования Gel Doc XR + Imaging System.

Содержание паратиреоидного гормона (ПТГ) и 25(OH)D общего в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа с применением оригинальных реагентов DRG (Марбург, Германия) на базе научно-исследовательской части ГрГМУ. Для анализа использовали однократно размороженную сыворотку крови. Уровень 25(OH)D 30–80 нг/мл расценивали как оптимальный, уровень 25(OH)D < 30 нг/мл – как D-гиповитаминоз.

Исследование показателей липидограммы с определением уровней общего холестерина (ОХ), ЛПВП, ЛПНП и ТГ проводили колориметрическим, ферментативным методом, используя оригинальные наборы фирмы Сogma (Польша). КА рассчитывали по формуле $КА = (ОХ - ЛПВП) / ЛПВП$.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы STATISTICA 10.0. Данные представлены в абсолютных числах в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{25} - Q_{75}$), а также в %. В каждой исследуемой группе проводили оценку соответствия распределения аллелей и генотипов равновесию Харди–Вайнберга. Полученное при этом значение $p > 0,05$ свидетельствовало о выполнении условий данного равновесия. При попарном сравнении переменных в случае, когда количество групп было больше двух, применяли Дункан-тест. Сравнение двух зависимых переменных проводили с помощью теста Вилкоксона. Для оценки взаимосвязи между переменными использовали корреляционный анализ Спирмана (R). Для сравнения независимых групп по типу «случай–контроль» с количественной оценкой статистической значимости связи между фактором и исходом рассчитывали отношение шансов (ОШ) с 95 %-ным доверительным интервалом (ДИ). Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При сравнительной оценке содержания липидов в плазме крови у пациентов с различными генотипам *BsmI* (B/b) и *FokI* (F/f) гена *VDR* достоверные различия были установлены только для ОХ, ТГ и КА, уровни которых были наибольшими при генотипе ВВ (табл. 1, 2).

Поскольку у 93 % обследованных уровень 25(OH)D в крови был ниже 30 нг/мл, представляется актуальным рассматривать полиморфизм гена *VDR* в сочетании с D-гиповитаминозом. При выделении в группах с разными генотипами по полиморфному маркера *BsmI* гена *VDR* лиц с D-гиповитаминозом уровень общего холестерина по-прежнему оставался наибольшим при рецессивном ВВ генотипе ($n = 11$) – 5,9 (5,4; 6,1) ммоль/л по сравнению с таковым при генотипах Вb ($n = 35$) – 4,7 (4,2; 5,5) ммоль/л ($p < 0,05$) и bb ($n = 28$) – 4,7 (3,7; 5,3) ммоль/л ($p < 0,05$). Известно, что генотип bb связан с экспрессией более активной формы *VDR* [10], т. е. при высокой аффинно-

сти *VDR* уровень ОХ ниже даже при D-гиповитаминозе. Уровень ТГ в крови при D-гиповитаминозе также оставался наибольшим при рецессивном ВВ генотипе ($n = 11$) – 1,8 (1,6; 4,0) ммоль/л по сравнению с таковым при генотипах Вb ($n = 33$) – 1,6 (1,4; 2,0) ммоль/л ($p < 0,05$) и bb ($n = 28$) – 1,7 (1,2; 2,3) ммоль/л ($p < 0,05$). КА при D-гиповитаминозе также был наибольшим ($p < 0,05$) в группе с ВВ генотипом. У лиц с ИБС при D-гиповитаминозе с доминантным аллелем b в генотипе bb или Вb полиморфизма *BsmI* ($n = 63$) уровни как ОХ, так и ТГ были ниже ($p = 0,001$) по сравнению с таковыми у лиц с генотипом ВВ ($n = 11$). Таким образом, у лиц с ИБС при D-гиповитаминозе при наличии доминантного аллеля b полиморфного маркера *BsmI* гена *VDR*, ассоциированного с более высокой аффинностью рецептора, уровни ОХ и ТГ достоверно ниже ($p = 0,001$), чем при рецессивном генотипе ВВ, ассоциированном с низкой аффинностью *VDR*.

При сравнении показателей липидограммы по 9 генотипам обеих полиморфных маркеров *BsmI* (bb или bB или ВВ) в сочетании с *FokI* (FF или Ff или ff) гена *VDR* уровень ОХ был наименьшим при генотипе bbff ($n = 7$) – 3,99 (3,5; 4,7) ммоль/л, содержание ТГ было наибольшим при ВВFf ($n = 5$) – 2,8 (1,8; 4,5) ммоль/л, а уровень КА был наибольшим при генотипе ВВFF ($n = 5$) – 3,8 (3,4; 5,5), достоверно отличаясь ($p < 0,05$) от такового при других генотипах. При наличии доминантного аллеля b (bb или Bb) и рецессивного аллеля f (Ff или ff) при D-гиповитаминозе уровень ОХ в плазме крови был достоверно ниже, чем при всех других сочетаниях генотипов (см. рисунок). В свою очередь при D-гиповитаминозе и доминантном b аллеле в сочетании с доминантным аллелем F – bbFF или ВВFF ($n = 25$) уровень ЛПВП был выше – 1,5 (1,3; 1,7) ммоль/л ($p = 0,048$), чем при сочетании bb или bB с Ff или ff ($n = 35$) – 1,4 (1,1; 1,7) ммоль/л. Уровень ТГ при D-гиповитаминозе имел аналогичную с ОХ направленность, однако достоверно не отличался у лиц с генотипом bb или Bb в сочетании с Ff или ff ($n = 36$) – 1,5 (1,2; 2,0) ммоль/л и bb или Bb в сочетании с FF ($n = 25$) – 1,9 (1,5; 2,4) ммоль/л и ВВFF ($n = 4$) – 1,6 (1,4; 2,9) ммоль/л. А при генотипе ВВFf или ВВff ($n = 7$) – 2,4 (1,7; 4,5) ммоль/л уровень ТГ был выше, чем при генотипе bb или Bb в сочетании с Ff или ff ($p = 0,05$) и bb или Bb в сочетании с FF ($p = 0,002$).

При сравнении частоты встречаемости гиперхолестеринемии (ОХ ≥ 4 ммоль/л) [11] выявлены различия между лицами с ИБС, имеющими в генотипе аллель B, и лицами с генотипом bb полиморфного маркера *BsmI* гена *VDR* (Pearson $\chi^2 = 6,3$; $p = 0,012$). У лиц с ИБС при наличии аллели B риск гиперхолестеринемии был в 4,3 раза выше, чем у лиц с генотипом bb (ОШ = 4,3; 95 % ДИ 1,3; 14,1). Частота встречаемости гиперхолестеринемии у пациентов с разными генотипами

Т а б л и ц а 1. Характеристика обследованных по генотипу полиморфного маркера *BsmI* (B/b) (rs1544410) гена *VDR* у лиц с ИБС

Table 1. Characteristics of the persons examined by the genotype of the polymorphic marker *BsmI* (B/b) (rs1544410) of the *VDR* gene in patients with ischemic heart disease

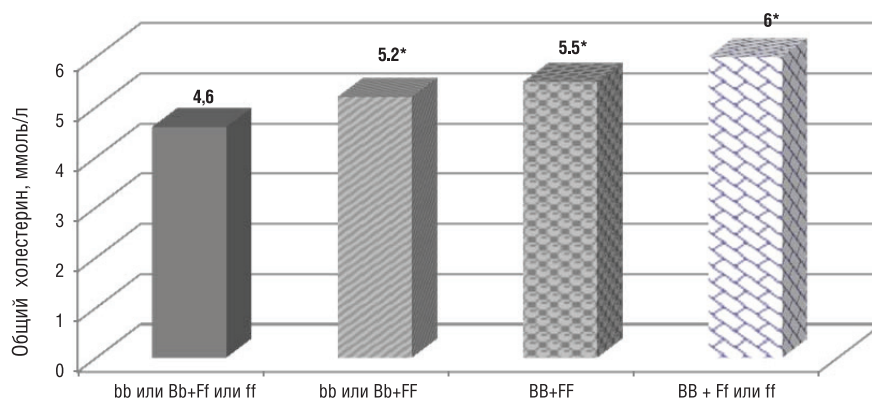
Показатель	Генотип		
	Bb ($n = 32$)	Bb ($n = 38$)	BB ($n = 12$)
ПТГ, пг/мл	49,3 (36,1; 66,0)	58,5 (33,0; 80,5)	65,1 (42,6; 71,9)
25(ОН)D, нг/мл	18,6 (9,5; 24,5)	14,3 (8,6; 21,0)	22,2 (16,4; 21,6)
ОХ, ммоль/л	4,7 (3,7; 5,4)	4,8 (4,2; 5,5)	5,95 (5,5; 6,5) ^{bBb}
ЛПНП, ммоль/л	2,4 (1,2; 3,5)	2,7 (2,1; 3,5)	3,3 (2,4; 3,7)
ЛПВП, ммоль/л	1,4 (1,2; 1,7)	1,5 (1,2; 1,7)	1,3 (1,1; 1,7)
ТГ, ммоль/л	1,7 (1,1; 2,3)	1,6 (1,4; 2,0)	1,8 (1,6; 3,4) ^{bBb}
КА	1,9 (1,5; 3,2)	2,7 (1,8; 3,3)	3,3 (2,1; 4,6) ^{bBb}

П р и м е ч а н и е. Статистически значимые различия ($p < 0,05$): ^b – при сравнении с генотипом bb; ^{Bb} – при сравнении с генотипом Вb.

Т а б л и ц а 2. Характеристика обследованных по генотипу полиморфного маркера *FokI* (F/f) (rs2228570) гена *VDR* у лиц с ИБС

Table 2. Characteristics of the persons examined by the genotype of the polymorphic marker *FokI* (F/f) (rs2228570) of the *VDR* gene in patients with ischemic heart disease

Показатель	Генотип F/f		
	FF ($n = 39$)	Ff ($n = 40$)	ff ($n = 18$)
ПТГ, пг/мл	57,6 (39,5; 73,1)	55,1 (33,6; 83,9)	37,4(31,9; 71,2)
25(ОН)D, нг/л	15,0 (8,9; 25,5)	14,4 (9,0; 21,0)	14,4 (8,7; 26,0)
ОХ, ммоль/л	5,2 (4,3; 6,3)	4,6 (4,0; 5,7)	4,8 (3,7; 5,6)
ЛПНП, ммоль/л	2,9 (2,0; 3,8)	2,3 (2,0; 3,5)	2,8 (1,5; 3,3)
ЛПВП, ммоль/л	1,4 (1,2; 1,7)	1,4 (1,1; 1,7)	1,5 (1,2; 1,8)
ТГ, ммоль/л	1,7 (1,2; 2,3)	1,8 (1,4; 2,3)	1,5 (1,0; 2,1)
КА	2,7 (1,9; 3,3)	2,4 (1,7; 3,4)	1,9 (1,6; 3,0)



Уровень общего холестерина при разных генотипах гена *VDR* при D-гиповитаминозе.

* – $p < 0,05$ при сравнении с генотипами bb или Bb + Ff или ff

The level of total cholesterol in different genotypes of the *VDR* gene with D-hypovitaminosis.

* – $p < 0,05$ in comparison with the genotypes bb or Bb + Ff or ff

FokI гена *VDR* достоверно не различалась, как и частота гипертриглицеридемии в группах, разделенных по обоим полиморфным маркерам.

Результаты исследований, указывающих на взаимосвязь полиморфизма *VDR* с липидным профилем плазмы крови, не однозначны. Так, к примеру, в российской популяции женщин, у которых не было ИБС, получены данные, аналогичные нашим, а именно при генотипе BB полиморфного маркера *BsmI* гена *VDR* уровень ТГ был выше, чем у носителей аллели b [12]. В исследовании китайских коллег, напротив, полиморфизм *BsmI* гена *VDR* не был связан с дислипидемией, а *FokI* полиморфизм *VDR* расценивался как фактор риска дислипидемии, при этом FF генотип был ассоциирован с гипертриглицеридемией [13]. По результатам обследования J. R. Ortлеpp с соавт. [14] 293 пациентов с высоким кардиоваскулярным риском и гиперхолестеринемией было установлено, что распространенность сахарного диабета II типа и ИБС зависела от количества В-аллелей. Однако выполненное J. R. Ortлеpp с соавт. [15] коронароангиографическое исследование с включением 3441 пациента показало, что полиморфизм *BsmI* гена *VDR* не связан с распространенностью и тяжестью ИБС. Как следует из имеющихся литературных данных, на сегодняшний день нет однозначного ответа на вопрос о взаимосвязи полиморфизма *VDR* с развитием дислипидемии и его роли.

Заключение. Таким образом, у лиц с ИБС при D-гиповитаминозе установлено следующее:

при наличии аллеля b в полиморфизме *BsmI* гена *VDR* уровни ОХ и ТГ достоверно ниже ($p = 0,001$), чем при генотипе BB;

при генотипе bb или Bb в сочетании с Ff или ff уровень ОХ в плазме крови наименьший по сравнению с таковым при других генотипах полиморфных маркеров *BsmI* и *FokI* гена *VDR*;

при генотипе bb или bB в сочетании с FF уровень ЛПВП выше ($p = 0,048$), чем при генотипе bb или bB в сочетании с Ff или ff;

при наличии аллеля B в полиморфизме *BsmI* риск гиперхолестеринемии в 4,3 раза выше, чем у лиц с генотипом bb (ОШ = 4,3; 95 % ДИ 1,3; 14,1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Association of Serum 25-hydroxyvitamin D with lifestyle factors and metabolic and cardiovascular disease markers: population-based cross-sectional study (FIN-D2D) / M. E. Miettinen [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N 7. – e100235.
2. Vitamin D deficiency is independently associated with the extent of coronary artery disease / M. Verdoia [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. – 2014. – Vol. 44, N 7. – P. 634–642.
3. High serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with a favorable serum lipid profile / R. Jorde [et al.] // Eur. J. Clin. Nutr. – 2010. – Vol. 64, N 12. – P. 1457–1464.
4. Позитивные эффекты приема холекальциферола на уровень липидов плазмы крови у лиц с артериальной гипертензией / Л. В. Янковская [и др.] // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2015. – № 3. – С. 78–84.
5. Значение витамина D в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний / В. В. Поворознюк [и др.] // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2015. – № 2 (50). – С. 6–14.

6. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers / A. Zittermann [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2009. – N 89 (5). – P. 1321–1327.
7. Influence of vitamin D supplementation on plasma lipid profiles: a meta-analysis of randomized controlled trials / H. Wang [et al.] // *Lipids Health Dis.* – 2012. – N 20. – P. 11–42.
8. 1,25-(OH)₂-vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus / J. Oh [et al.] // *Circulation.* – 2009. – N 120. – P. 687–698.
9. Differential regulation of apolipoprotein A-I gene expression by vitamin D receptor modulators / K.R. Wehmeier [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – N 1780 (2). – P. 264–273.
10. Leeuwen genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms / A.G. Uitterlinden [et al.] // *Gene.* – 2004. – N 338. – P. 143–156.
11. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза // Российские рекомендации. – V пересмотр. – М., 2012. – 25 с.
12. Каронова, Т.Л. Метаболические и молекулярно-генетические аспекты обмена витамина D и риск сердечно-сосудистых заболеваний у женщин : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Т.Л. Каронова. – СПб., 2014. – 20 с.
13. Association of vitamin D receptor Fok I and Bsm I polymorphisms with dyslipidemias in elderly male patients with type 2 diabetes / Z. Xia [et al.] // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* – 2014. – N 34 (11). – P. 1562–1568.
14. The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease / J.R. Ortlepp [et al.] // *Diabet Med.* – 2001. – N 18 (10). – P. 842–845.
15. Vitamin D receptor gene polymorphism BsmI is not associated with the prevalence and severity of CAD in a large-scale angiographic cohort of 3441 patients / J.R. Ortlepp [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2003. – N 33 (2). – P. 106–109.

References

1. Miettinen M. E., Kinnunen L., Leiviskä J., Keinänen-Kiukaanniemi S., Korpi-Hyövälti E., Niskanen L., Oksa H., Saaristo T., Tuomilehto J., Vanhala M., Uusitupa M., Peltonen M. Association of serum 25-hydroxyvitamin D with lifestyle factors and metabolic and cardiovascular disease markers: population-based cross-sectional study (FIN-D2D). *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 7, e100235.
2. Verdoia M., Schaffer A., Sartori C., Barbieri L., Casetti E., Marino P., Galasso G., de Luca G. Vitamin D deficiency is independently associated with the extent of coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 2014, vol. 44, no. 7, pp. 634–642.
3. Jorde R., Figenschau Y., Hutchinson M., Emaus N., Grimnes G. High serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with a favorable serum lipid profile. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2010, vol. 64, no. 12, pp. 1457–1464.
4. Yankovskaya L. V., Snezhitskiy V. A., Lyalikov S. A., Pludovskiy P., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Positive effects of cholecalciferol supplementation on plasma lipid levels in patients with arterial hypertension. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University], 2015, no. 3, pp. 78–84 (in Russian).
5. Povoroznyuk V. V., Snezhitskiy V. A., Yankovskaya L. V., Maylyan E. A., Reznichenko N. A., Maylyan D. E. Extraskeletal effects of vitamin D: role in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University], 2015, vol. 2, no. 50, pp. 6–14 (in Russian).
6. Zittermann A., Frisch S., Berthold H. K., Gotting C., Kuhn J., Kleesiek K., Stehle P., Koertke H., Koerfer R. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol. 89, no. 5, pp. 1321–1327.
7. Wang H., Xia N., Yang Y., Peng D.-Q. Influence of vitamin D supplementation on plasma lipid profiles: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids in Health and Disease*, 2012, no. 20, pp. 11–42.
8. Oh J., Weng S., Felton S. K., Bhandare S., Riek A., Butler B., Proctor B. M., Petty M., Chen Z., Schechtman K. B., Bernal-Mizrachi L., Bernal-Mizrachi C. 1,25-(OH)₂-vitamin inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 2009, no. 120, pp. 687–698.
9. Wehmeier K. R., Mazza A., Hachem S., Ligaray K., Mooradian A. D., Wong N. C. W., HaasK M. J. Differential regulation of apolipoprotein A-I gene expression by vitamin D receptor modulators. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, vol. 1780, no. 2, pp. 264–273.
10. André G. Uitterlinden, Yue Fang, Joyce B. J. van Meurs, Huibert A. P. Pols, Johannes P. T. M. van Leeuwen. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, 2004, no. 338, pp. 143–156.
11. Russian guidelines: diagnosis and correction of lipid metabolism disorders in order to prevention and treatment of atherosclerosis. *Rossiyskie rekomendatsii, V peresmotra* [Russian guidelines], Moscow, 2012. 25 p. (in Russian).
12. Karonova T. L. *Metabolic and molecular genetic aspects of vitamin D metabolism and the risk of cardiovascular disease in women*. Abstract of diss. St. Petersburg, 2014. 20 p. (in Russian).
13. Xia Z., Hu Y, Zhang H, Han Z, Bai J, Fu S, Deng X, He Y. Association of vitamin D receptor Fok I and Bsm I polymorphisms with dyslipidemias in elderly male patients with type 2 diabetes. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2014, vol. 34, no. 11, pp. 1562–1568.
14. Ortlepp J. R., Lauscher J., Hoffmann R., Hanrath P., Joost H. G. The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabetic Medicine*, 2001, vol. 18, no. 10, pp. 842–845.
15. Ortlepp J. R., von Korff A., Hanrath P., Zerres K., Hoffmann R. Vitamin D receptor gene polymorphism BsmI is not associated with the prevalence and severity of CAD in a large-scale angiographic cohort of 3441 patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 2003, vol. 33, no. 2, pp. 106–109.

Информация об авторах

Янковская Людмила Валерьевна – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: yankovliuda@yandex.by.

Снежицкий Виктор Александрович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, ректор. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: snezh@grsmu.by.

Ляликов Сергей Александрович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: lalikov@tut.by.

Степура Татьяна Леонидовна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: mikhno_t@yahoo.com.

Information about the authors

Liudmila V. Yankouskaya – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: yankovliuda@yandex.by.

Victor A. Snezhitskiy – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Rector. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: snezh@grsmu.by.

Sergey A. Lyalikov – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: lalikov@tut.by.

Tatyana L. Stepuro – Ph. D. (Biol.), Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: mikhno_t@yahoo.com.

А. А. Астроўскі¹, В. А. Гурыновіч¹, Ю. З. Максімчык¹, А. Б. Астроўская², С. Д. Арэхаў²,
А. Г. Майсяёнак¹

¹Інстытут біяхіміі біялагічна актыўных злучэнняў НАН Беларусі, Гродна, Рэспубліка Беларусь

²Гродзенскі дзяржаўны медыцынскі ўніверсітэт, Гродна, Рэспубліка Беларусь

ЗМЯНЕННЕ ГІСТАЛАГІчнай СТРУКТУРЫ НАДНЫРКАВЫХ ЗАЛОЗ ПАЦУКОЎ Пад уздзеяннем прэднізалона і яго камбінацыі з вітамінам D

Анотацыя. Изучено одновременное воздействие преднизолона и витамина D на гистологическую структуру надпочечниковых желез лабораторных крыс. Животным ежесуточно в течение 3 недель внутрижелудочно вводили либо физраствор, либо преднизолон в дозе 5 мг/кг массы тела, либо преднизолон в комбинации с витамином D в дозе 800 МЕ/кг. Надпочечники фиксировали в смеси формалин–спирт–уксусная кислота, заливали в парафин, делали серийные срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Показано, что введение витамина D нормализовало пролиферацию и апоптоз клеток коры надпочечниковых желез, измененных под влиянием преднизолона, однако не обеспечивало восстановления размеров желез. Введение витамина D вместе с преднизолоном способствовало накоплению липофуцина в сетчатой зоне коры надпочечников.

Ключевые слова: крысы, кора надпочечниковых желез, преднизолон, витамин D, митоз, апоптоз, липофуцин

Для цитирования: Змяненне гісталагічнай структуры надныркавых залоз пацукоў пад уздзеяннем прэднізалона і яго камбінацыі з вітамінам D / А. А. Астроўскі [і інш.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 77–85.

A. A. Astrowski¹, V. A. Gurynovich¹, Yu. Z. Maksimchyk¹, A. B. Astrowskaya², S. D. Arekhau², A. G. Moiseenok¹

¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,

Grodno, Republic of Belarus

²Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

CHANGES IN THE HISTOLOGICAL STRUCTURE OF RAT ADRENAL GLANDS EXPOSED TO PREDNISOLONE AND ITS COMBINATION WITH VITAMIN D

Abstract. The combined effects of prednisolone and vitamin D on the rat adrenal histological structure was studied. The animals were administered with 5 mg/kg of either saline, or prednisolone intragastrically, daily over 3 weeks, or prednisolone in combination with vitamin D (at a dose of 800 IU/kg). The adrenals were fixed in a mixture of formalin-ethanol-acetic acid, embedded in paraffin and serial sections were made which were stained with hematoxylin and eosin. It was found that although vitamin D was beneficial for normalization of proliferation and apoptosis of adrenal cortical cells changed under the exposure to prednisolone, it did not contribute to recovering of the gland size. Vitamin D in combination with prednisolone contributed to storing of lipofuscin in the reticular layer of the adrenal cortex.

Keywords: rats, adrenal cortex, prednisolone, vitamin D, mitosis, apoptosis, lipofuscin

For citation: Astrowski A. A., Gurynovich V. A., Maksimchyk Yu. Z., Astrowskaya A. B., Arekhau S. D., Moiseenok A. G. Changes in the histological structure of rat adrenal glands exposed to prednisolone and its combination with vitamin D. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 77–85 (in Russian).

Уводзіны. Вітамін D быў адкрыты ў 1920-я гады як рэчыва, якое неабходна для фарміравання касцявой тканкі [1]. У сярэдзіне XX ст. высветлілася, што вітамін D мае гарманальныя ўласцівасці [2–4] і можа ўздзейнічаць у рэгуляцыі прадукцыі стэроідных гармонаў [5].

На паверхні клетак і ў іх ядрах знаходзіцца рэцэптар да вітаміна D – VDR [3, 4, 6], праз які вітамін уплывае на працэсы клеткавай праліферацыі і дыферэнцыроўкі [7]. Ёсць такі рэцэптар і ў надныркавых залозах млекакормячых [3, 7, 8]. Хаця, напрыклад, у коркавым слаі наднырка мышэй яго можа і не быць [9].

На лабараторных пацуках паказана, што вітамін D стымулюе дзяленне храмафінных клетак мазгавога рэчыва надныркавых залоз [10], але магчымасці ўплыву гэтага вітаміна-гармона

на праліферацыю клетак кары дадзеных органаў да сённяшняга дня застаюцца неправеранымі. Глыбей даследаваць уздзеянне вітаміна D на надныркавыя залозы прапануюць і клініцысты [8].

Прэднізалон, як і іншыя глюкокартыкоіды, пры працяглым увядзенні ў арганізм выклікае атрафію кары наднырнікаў [11] і, верагодна, здольны памяншаць экспрэсію рэцэптара VDR [12].

Сучасныя даследаванні холекальцыферола як вітаміна-гармона дазволілі сфармуляваць уяўленне пра вітамін D як фактар з пашыраным спектрам біялагічных функцый, які мае дачыненне да рэгуляцыі тонуса сасудаў, анкапратэктыві, функцыянальнага стану мышачнай і нервовай сістэм і інш. Выяўлена супрацьзапаленчая і імунамадулюючая дзейнасць гарманальнай формы – 1,25-дзгідроксіхолекальцыферола ($1,25(\text{OH})\text{D}_3$), так званая кальцытрыёла [2, 3]. Гэта сведчыць аб шчыльнай функцыянальнай сувязі D-вітаміннага статусу арганізма млекакормячых і стану кары іх надныркавых залоз. Нарэшце, субхранічнае ўвядзенне прэднізалону можа быць выкарыстана для мадэлявання D-вітаміннай недастатковасці.

Мэта дадзенага даследавання – выяўленне і ацэнка з дапамогай новага падыхода, заснаванага на магчымасцях сучаснай лічбавай тэхнікі, зрухаў у морфафункцыянальнай арганізацыі кары надныркавых залоз лабараторных пацукоў пасля адначасовага (фактычна канкурэнтнага) уздзеяння вітаміна D і прэднізалона.

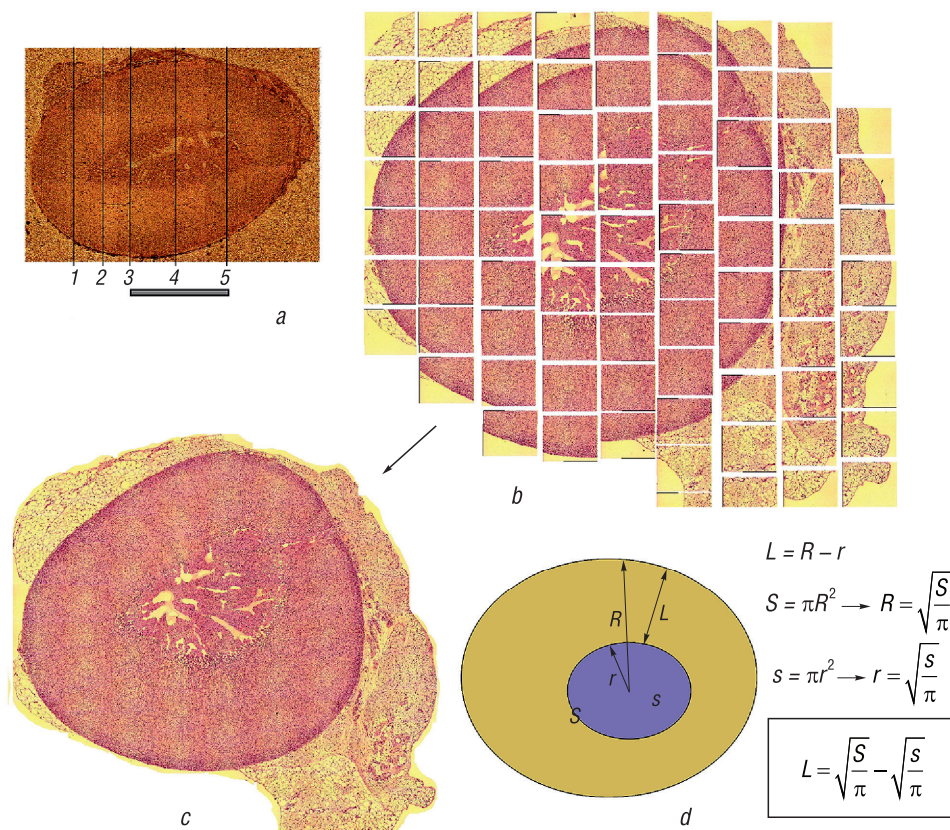
Матэрыялы і метады даследавання. Было выкарыстана 18 белых лабараторных пацукоў-самцоў масай 170 ± 24 г. Жывёлы выпадковым чынам былі падзелены на тры групы па 6 асобін у кожнай і размешчаны ў асобных клетках. Пацукам на працягу 21 сут унутрыстраўнікава ўводзілі альбо фізіялагічны раствор хларыда натрыя (жывёлы першай кантрольнай групы), альбо 5 мг/кг масы распушчанага ў фізрастворы прэднізалону (другая група), альбо прэднізалон у адзначанай дазіроўцы разам з 800 МА/кг масы вітаміна D (трэцяя група).

Пасля ўвядзення названых рэчываў пацукоў забівалі шляхам хуткай дэкапітацыі. Ускрывалі брушную поласць і ў кожнага з пацукоў забіралі левую надныркавую залозу. Яе фіксавалі ў сумесі 40 %-нага фармаліна, 96-градуснага этылавага спірту, канцэнтраванай воцатнай кіслаты (суадносіны вадкасцяў 9:3:1 адпаведна). У далейшым органы прамывалі праточнай вадой, абязводжвалі ў спіртах і ксілоле, залівалі ў парафін (падчас заліўкі залозы размяшчалі з улікам іх авальнай формы, каб павялічыць верагоднасць атрымання прадольных зрэзаў). Пазней рабілі серыйныя зрэзы залоз таўшчынёй 4 мкм.

Каб не прапусціць цэнтральную зону залозы, выкарыстоўвалі наступны падыход. Калі ў ходзе рэзкі пачынала зрэзацца тканка надныркавай залозы, распраўленыя на вадзе парафінавыя зрэзы размяшчалі на шкле і праглядалі ў мікраскоп. Калі ў зрэзах прысутнічала толькі кара надныркавай залозы (мал. 1, *a*; лінія 1), такія зрэзы выключалі з даследавання. Як толькі разам з карой пачынала рэзацца і мазгавое рэчыва, на прадметнае шкло з кожных 20–25 зрэзаў бралі 5. Па меры таго, як павялічвалася верагоднасць рэзання менавіта цэнтральнай часткі органа, на прадметнае шкло бралі 5 зрэзаў з кожных 10–15. Так рабілі да таго моманту, пакуль на парафінавых зрэзах не пачынаў памяншацца памер мазгавога рэчыва (мал. 1, *a*).

Усе абраныя для далейшага даследавання зрэзы афарбоўвалі гематаксілінам Карачы і эзінам. Затым, праглядаючы зрэзы ў мікраскоп, ад кожнай залозы выбіралі той зрэз, плошча мазгавога рэчыва якога была найбольшай. Гэты зрэз лічылі цэнтральным, г. зн. галоўным для кожнай залозы. Яго фатаграфавалі з дапамогай лічбавай фотакамеры (Panasonic color CCTV camera WV-CP410/G), выкарыстоўваючы аб'ектыў з 10-кратным павелічэннем (мал. 1, *b*). Прычым рабілі гэта так, каб кожнае чарговае поле зроку перакрывала папярэднія нахштальт чарапіцы. З атрыманых фота з дапамогай кампутарнай праграмы Paint складалі поўнае электроннае фота цэнтральнага зрэза кожнага наднырніка (мал. 1, *c*).

На атрыманых фота цёмным колерам праводзілі дзве тонкія лініі. Адна з іх пазначала вонкавы край коркавага рэчыва, другая – мяжу паміж сеткавай зонай кары і мазгавым рэчывам. Арыентуючыся на гэтыя лініі, з дапамогай кампутарнай праграмы Image-Pro Plus у ручным рэжыме вымяралі агульную абсалютную плошчу папярочнага зрэза органа і абсалютную плошчу мазгавога рэчыва на зрэзе ($y \text{ мм}^2$). На падставе атрыманых даных вылічвалі абсалютную і адносную плошчу коркавага рэчыва на зрэзах ($y \text{ мм}^2$ і ў % адпаведна). Знаходзілі таксама сярэдняю таўшчыню кары. Пры гэтым зрэз надныркавай залозы ўяўлялі як два колы, устаўле-



Мал. 1. Некаторыя этапы выяўлення цэнтральнага зрэза, яго фатаграфавання і вымярэння: *a* – фота неафарбаванага парафінавага зрэза надныркавай залозы пацука з нанесенымі лініямі, якія праходзяць праз коркавае (лінія 1) і мазгавое (лініі 2–5) рэчывы органа. Зрэзы, якія браліся для афарбоўкі і наступнага вывучэння ў мікраскопе, належалі да інтэрвала 3–5. Цэнтральным з’яўляўся зрэз, які праходзіў па лініі 4; *b–c* – выраб поўнага фота цэнтральнага зрэза залозы з асобных фота ($\times 100$); *d* – формула для вылічэння сярэдняй таўшчыні кары надныркавых залоз пацукоў (L).

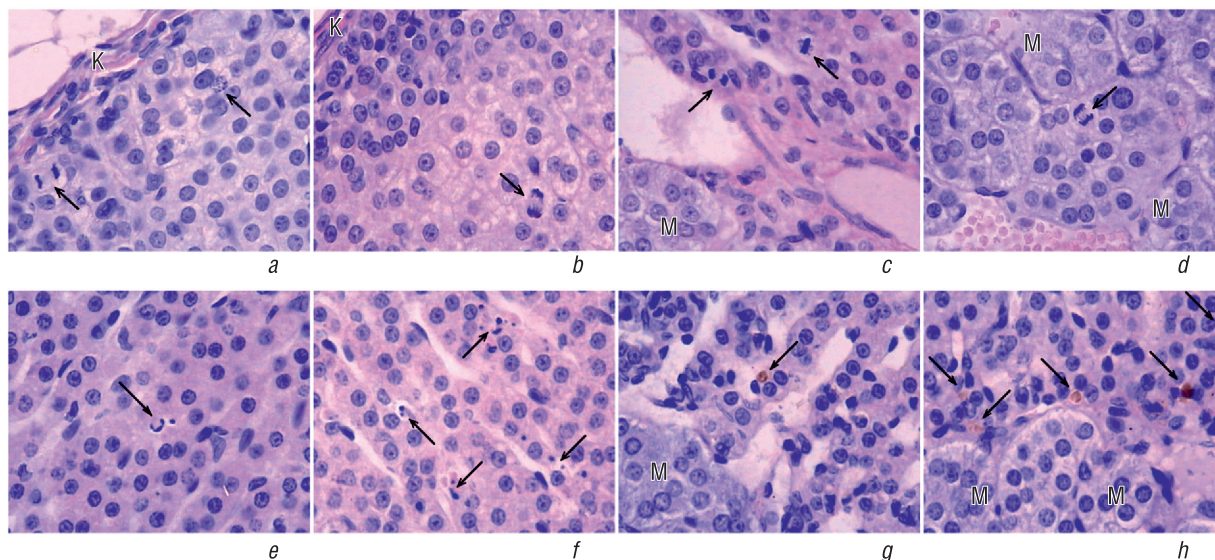
Гэты паказчык знаходзілі па розніцы паміж сярэднімі радыусамі залозы і яе мазгавога рэчыва ($L = R - r$)

Fig. 1. Some steps in finding of the “central” section and its photographing and measuring: *a* – photo of unstained paraffin rat adrenal section with superimposed lines which go across cortical (line 1) and medullary substances of the organ (lines 2–5). Sections which were taken for staining and subsequent microscopic examination belonged to the intervals 3–5. The central is the section which goes on the line 4; *b–c* – a complete photo of the central gland section made of individual photos ($\times 100$); *d* – deriving a formula for calculation of the rat adrenal cortex average thickness (L). This parameter was found from the difference between the average gland radius and the average radius of its medullary substance ($L = R - r$)

няя адно ў адно. Таўшчыню кары вылічвалі як розніцу паміж радыусамі гэтых колаў (радыусы ў сваю чаргу знаходзілі, ведаючы плошчу колаў; гл. мал. 1, *d*).

Дадаткова, праглядаючы прэпарат пры 400-кратным павелічэнні у рэжыме сканіравання, падлічвалі колькасць мітатычных фігур, якія можна было знайсці на цэнтральным зрэзе кары наднырніка (пры гэтым улічвалі таксама, у якім слаі быў заўважаны мітоз – клубочкавым, пучковым ці сеткавым (мал. 2, *a–d*); падлічвалі колькасць мітозаў у мазгавым рэчыве на трох зрэзах (цэнтральным і двух суседніх); колькасць груп апаптатычных цельцаў у кары на цэнтральным зрэзе органа (за адну групу апаптатычных цельцаў прымалі не менш за два апаптатычныя цельцы, утвораныя з матэрыялу ядра клеткі, якія знаходзіліся адзін ад аднаго на адлегласці, не большай за памер адной клеткі (мал. 2, *e, f*); таксама падлічвалі колькасць плям ліпафусцына (мал. 2, *g, h*), якія знаходзіліся на тэрыторыі сеткавай зоны кары цэнтральнага зрэза органа на адлегласці не большай за адно поле зроку мікраскопа ($\times 400$) ад вонкавага краю мазгавога рэчыва. Атрыманыя паказчыкі суадносілі са знойдзенай раней плошчай кары і мазгавога рэчыва наднырнікаў.

Усе атрыманыя колькасныя даныя апрацоўвалі з дапамогай статыстычнай праграмы STATISTICA 10. Вынікі падавалі як сярэдняе арыфметычнае \pm памылка сярэдняй ($M \pm m$). Для ацэнкі дакладнасці адрозненняў паміж сярэднімі выкарыстоўвалі *t*-крытэрыі Ст’юдэнта. Даставернымі лічылі адрозненні пры $p < 0,05$.



Мал. 2. Фігуры мітозаў (*a–d*) у надныркавых залозах пацукоў (*a* – у клубочкавым слаі кары, *b* – у пучковым слаі, *c* – у сеткавым слаі, *d* – мітоз храмафіннай клеткі мазгавога рэчыва наднырніка); адна і некалькі груп апататычных цельцаў у коркавым рэчыве надныркавых залоз (*e–f*); плямкі ліпафусцына (адна і некалькі) у сеткавым слаі кары наднырнікаў (*g–h*). К – капсула наднырніка; М – мазгавое рэчыва. Адпаведныя структуры паказаны стрэлкамі. $\times 400$

Fig. 2. Mitoses (*a–d*) in the rat adrenal glands: *a*, in the cortex glomerular layer, *b*, in fascicular cortex layer; *c*, in the reticular layer; *d*, mitosis in chromaffin cell of adrenal medullary substance; *e–f*: stains of lipofuscin (one or several) in adrenal cortex reticular layer; *g–h*. К – adrenal capsule; М – medullary substance. The corresponding structures are indicated by the arrows. $\times 400$

Вынікі і іх абмеркаванне. У даследаванні выкарыстаны новы падыход да морфаметрычнай характарыстыкі надныркавых залоз пацукоў, заснаваны на выяўленні і наступным морфаметрычным аналізе цэнтральнага зрэза, г. зн. зрэза з найбольшай абсалютнай плошчай мазгавога рэчыва.

Вынікі нашага даследавання паказалі, што ў жывёл кантрольнай групы, напрыклад, адносна плошча мазгавога рэчыва займала на цэнтральным зрэзе органа ў сярэднім 14,4 % ад усёй плошчы зрэза. Пры аналагічных вымярэннях, зробленых на аснове ранейшых тэхнічных магчымасцяў, гэты паказчык у сярэднім складаў 12,1 % [13], што блізка да атрыманага намі значэння.

Калі ўзяць за аснову наднырнік аднаго з пацукоў кантрольнай групы з найбольшай доляй мазгавога рэчыва на зрэзе (18,9 %) і яго абсалютныя параметры (абсалютная плошча наднырніка на зрэзе 6,19 мм², абсалютная плошча мазгавога рэчыва на зрэзе 1,17 мм²), то, ведаючы формулу сувязі паміж аб'ёмам шара і яго радыусам ($V = 4/3\pi r^3$), а таксама выкарыстаўшы мадэль двух шароў, устаўленых адзін у адзін (гл. мал. 1, *d*), можна разлічыць, што абсалютны аб'ём мазгавога рэчыва ў дадзеным выпадку быў каля 0,95 мм³, або каля 8,2 % ад аб'ёму ўсяго наднырніка. У большасці пацукоў кантрольнай групы гэтыя параметры былі меншымі. Пры гэтым варта адзначыць, што аб'ём мазгавога рэчыва чалавека складае каля 9 % ад аб'ёму яго надныркавых залоз [14].

Зрэзы тыповых надныркавых залоз, узятых у жывёл трох груп, паказаны ў параўнанні на мал. 3. Бачна, што залозы жывёл «прэднізалонавай» і «прэднізалонава-вітаміннай» груп маюць меншыя памеры, чым залозы жывёл кантрольнай групы.

Даныя, датычныя памераў залоз, іх мазгавой і коркавай частак, прыведзены ў табл. 1. З іх вынікае, што прэднізалон у выкарыстанай дозе выклікаў даставернае памяншэнне як агульнага памеру надныркавых залоз, так і абсалютнага ды адноснага памераў іх кары, а таксама памяншаў таўшчыню апошняй. Пры гэтым абсалютная плошча мазгавога рэчыва, як бачна на цэнтральных папярочных зрэзах, даставерна не змянялася.

Дадатковае ўвядзенне вітаміна D не паўплывала на адзначаныя зрухі – у жывёл, якім уводзілі прэднізалон разам з вітамінам D, усе вымераныя паказчыкі былі такімі ж, як і ў групе пацукоў, якім уводзілі адзін прэднізалон.



Мал. 3. Прыкладныя суадносіны памераў надныркавых залоз, узятых у «кантрольнага» (а), «прэднізалонавага» (b) і «прэднізалонава-вітаміннага» (с) пацукоў. Мяжа паміж карой і мазгавым рэчывам органа дадаткова пазначана лініяй
 Fig. 3. Approximate relationships between the sizes of adrenal glands taken from control rats (a), prednisolone-treated rats (b) and rats treated by a combination of prednisolone and vitamin D (c). The border between cortex and medullary substance was additionally indicated by a line

У тканках усіх надныркавых залоз можна было выявіць клеткі ў стане мітатычнага дзялення, групы апаптатычных цельцаў, якія размяшчаліся пераважна на мяжы пучкавай і сеткавай зон кары, жоўта-карычневыя плямкі ліпафусцына, якія знаходзіліся ў сеткавым пласце коркавага рэчыва наднырнікаў пераважна паблізу ад мазгавога рэчыва. Даныя, якія характарызуюць уплыў прэднізалона і яго камбінацыі з вітамінам D на колькасць названых структур, прыведзены ў табл. 2, 3.

Як вынікае з табл. 2, 3, увядзенне прэднізалона выклікала істотнае памяншэнне праліферацыі клетак ва ўсіх сляях коркавага рэчыва і даставерна не ўплывала на аналагічны працэс у мазгавым рэчыве. Гэтае ж уздзеянне на арганізм жывёл вяло да павелічэння праяў апаптозу і тэндэнцыі да назапашвання глыбак ліпафусцыну ў кары наднырнікаў (заўвага: пры разліку па Мана–Уітні даставернасці павелічэння колькасці груп апаптатычных цельцаў пад уплывам прэднізалона $p < 0,05$).

Увядзенне ў арганізм жывёл разам з прэднізалонам вітаміна D вяртала ўсе параметры мітатычнай актыўнасці да нармальных значэнняў. Практычна тое ж адбылося і з актыўнасцю апаптозу. Аднак назапашванне ліпафусцына ў наднырніках не толькі не паменшылася (ці засталася на «прэднізалонавым» узроўні), а істотна павялічылася.

Такім чынам, на працэс праліферацыі клетак коркавага рэчыва надныркавых залоз, а таксама на іх апаптоз прэднізалон і вітамін D аказалі супрацьлеглае ўздзеянне – блакавалі ўплыў адзін аднаго. Што да працэсу ўтварэння ліпафусцына, відавочна праяўленне сінэргічнага эфекта.

Т а б л і ц а 1. Змена асноўных анатама-гісталагічных паказчыкаў будовы надныркавых залоз пацукоў пад уплывам прэднізалона і прэднізалона ў камбінацыі з вітамінам D

Table 1. Changes in the main anatomic and histological indices in the structure of rat adrenal glands under exposure to prednisolone and prednisolone in combination with vitamin D

Група	Абсалютная плошча, мм ²			Адносная плошча кары на зрэзе, %	Таўшчыня кары, мм
	надныркавай залозы на зрэзе	кары на зрэзе	мазгавога рэчыва на зрэзе		
Кантроль	5,59±0,45	4,77±0,36	0,82±0,11	85,6±1,17	0,82±0,03
Прэднізалон	3,86±0,46**	3,14±0,37**	0,73±0,10	81,2±0,84**	0,62±0,04**
Прэднізалон + вітамін D	3,59±0,19**	2,88±0,19**	0,71±0,01	79,9±1,04**	0,59±0,03**

З а ў в а г а. Дакладнасць адрозненняў у параўнанні з кантрольнай групай: * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,05$. Тое ж у табл. 2, 3.

Таблица 2. Змена митатычнай актыўнасці ў надныркавых залозах пацукоў пад уплывам прэднізалона і прэднізалона ў камбінацыі з вітамінам D

Table 2. Changes in mitotic activity in rat adrenal glands under exposure to prednisolone and prednisolone in combination with vitamin D

Група	Колькасць мітозаў у кары надныркавых залоз у разліку на 1 мм ² плошчы зрэза				Колькасць мітозаў у разліку на 1 мм ² плошчы мазгавага рэчыва
	усяго	у клубочкавым слаі	у пучковым слаі	у сеткавай зоне	
Кантроль	3,66±0,47	1,78±0,33	1,17±0,17	0,70±0,17	1,04±0,34
Прэднізалон	0,91±0,34**	0,49±0,16**	0,21±0,16**	0,22±0,10**	0,69±0,27
Прэднізалон + вітамін D	4,25±1,37	1,51±0,49	1,45±0,61	1,30±0,69	0,695±0,26

Таблица 3. Колькасць груп апататычных цельцаў і плям ліпафусцына ў кары наднырнікаў пад уплывам прэднізалона і прэднізалона ў камбінацыі з вітамінам D

Table 3. Apoptotic bodies and lipofuscin in adrenal cortex under exposure to prednisolone and prednisolone in combination with vitamin D

Група	Колькасць груп апататычных цельцаў у коркавым рэчыве		Колькасць плям ліпафусцына ў сеткавай зоне коркавага рэчыва на цэнтральным зрэзе органа
	на цэнтральным зрэзе органа	у разліку на 1 мм ² зрэза	
Кантроль	1,17±0,48	0,24±0,095	4,3±1,0
Прэднізалон	61,8±28,6**	18,2±8,52**	18,8±7,3*
Прэднізалон + вітамін D	1,67±0,42	0,62±0,16*	48,2±8,5**

Тое, што ў цытаплазме клетак сеткавай зоны кары надныркавых залоз знаходзіцца «пігмент старэння» ліпафусцын, шырока вядома [15, 16]. Але ж на атрыманых фота бачна, што ліпафусцын размешчаны ў гэтай зоне не толькі дыфузна, а і сканцэнтраваны ў цытаплазме асобных клетак (гл. мал. 2, *g, h*). Верагодна, што ў асабліва вялікай колькасці назапашваюць ліпафусцын не столькі клеткі сеткавай зоны кары, дыферэнцаваныя для выпрацоўкі палавых гармонаў, колькі макрафагі [17, 18], якія фагацытуюць састарэлыя клеткі кары, а недэградуемы ферментамі ліза-сом ліпафусцын назапашваюць у цытаплазме.

Па выніках даследавання таксама паўстала пытанне: чаму нармалізацыя праліфератыўнай актыўнасці клетак надныркавых залоз і іх апатозу (таго, што было істотна зменена ўвядзеннем прэднізалона) не забяспечыла ні аднаўлення нармальнага памераў гэтых органаў, ні аб'ёму іх коркавага рэчыва (гл. табл. 1)?

Можна прапанаваць дзве версіі:

1) як толькі вітамін D ініцыяваў (у канцы 21-сутачнага перыяду яго ўвядзення) станоўчы ўплыў на праліфератыўную актыўнасць клетак, наступаў канец эксперымента, а таму вітамін не паспеваў паўплываць на вяртанне да нормы памераў залоз;

2) вітамін D, стымулюючы праліфератыўную актыўнасць клетак кары надныркавых залоз, адначасова інтэнсіфікуе працу своеасаблівага «клеткавага канвеера» (калі клетка, утвораная са ствалавой у раёне клубочкавай зоны кары, перамяшчаецца ў пучковую, затым у сеткавую зону, пакуль не выходзіць на мяжу з мазгавым рэчывам, дзе заканчвае свой жыццёвы цыкл [19, 20]), які пачынае працаваць у паскораным рэжыме. Пры такім эфекце сапраўды можа не назірацца істотнага ўплыву павышэння митатычнай актыўнасці клетак кары на памеры органа.

Дарэчы, апошні варыянт тлумачэння падмацоўвае факт, што менавіта пры сумесным прызначэнні прэднізалона і вітаміна D у найбольшай ступені павялічвалася колькасць плям ліпафусцына ў сеткавай зоне кары (табл. 3). Прычым іх станавілася больш не толькі ў параўнанні з кантролем, але і ў параўнанні з паказчыкамі чыста «прэднізалонавай» групы (больш загінулых клетак кары фагацытавана – больш ліпафусцына назапашана).

Гэта гіпотэза патрабуе праверкі, як і высвятленне пытання, ці здольна сеткавая зона кары надныркавых залоз вызваліцца ад ліпафусцынавых «запасаў», калі спыніцца ўздзеянне чыннікаў, якія выклікалі такое анамальнае назапашванне?

Такім чынам, адчыняецца новая старонка вывучэння «пазакаасцявых» эфектаў холекацыферола, які, магчыма, праз функцыі $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ і VDR-рэцэпцыю можа выступаць у якасці «рэгулятара» марфагенезу клетак кары надныркавых залоз. Аб гэтым сведчаць і рэгуляцыя кальцытрыёлам экспрэсіі шматлікіх генаў, і мадуляцыя унутрыклеткавых сігнальных каскадаў [2], што тлумачыць плейятропныя функцыі вітаміна D.

Нарэшце, вяртаючыся да асноўнай мэты дадзенага даследавання, варта звярнуць увагу на тое, што атрыманы вынік – а менавіта феномен, што вітамін D ва ўплыве на праліферацыю і апатоз клетак кары надныркавых залоз з'яўляецца антаганістам прэднізалона – можа мець істотнае значэнне для медыцынскай практыкі. Прызначэнне пацыетнам вітаміна D можа аказацца карысным на фоне ўвядзення вялікіх доз прэднізалона (ці іншых глюкокартыкоідаў) і паспрыяць памяншэнню магчымых непажаданых ўскладненняў, якія агульнавядомыя пры прэднізалона-тэрапіі.

Заклучэнне. Прэднізалон пасля штосутачнага ўнутрыстраўнікавага ўвядзення пацукам у дозе 5 мг/кг масы на працягу 3 тыдняў выклікае памяншэнне агульных памераў надныркавых залоз пераважна за кошт памяншэння аб'ёма коркавага рэчыва. Пры гэтым памяншаецца праліферацыя клетак кары, у пэўнай ступені павялічваецца іх апатоз, назіраецца тэндэнцыя да назапашвання ліпафусцына. Дадатковае ўвядзенне вітаміна D у дозе 800 МА/кг масы жывёл спрыяе нармалізацыі праліферацыі і апатозу клетак кары надныркавых залоз, змененых пад уплывам прэднізалона, аднак не вядзе да аднаўлення іх памераў і дадаткова спрыяе назапашванню ліпафусцыну ў сеткавай зоне кары.

Атрыманыя вынікі патрабуюць больш глыбокага вывучэння ўзаемадзеяння вітаміна D з глюкокартыкоідамі ва ўздзеянні на кару надныркавых залоз млекакормячых, а таксама вывучэння магчымасці выкарыстання вітаміна D у медыцынскай практыцы ў якасці рэчыва, патэнцыйна здольнага зніжаць негатыўныя наступствы як прымянення вялікіх доз глюкокартыкоідаў, так і іх адмены.

Падзякі. Праца выканана ў межах праекта 5.11 «Аптымізацыя біядаступнасці вітаміна D пры недастатковасці вітаміна і выкарыстанні розных кальцый-утрымліваючых субстанцый» ДПНД «Хімічныя тэхналогіі і матэрыялы».

Acknowledgements. This work was performed as a part of the project 5.11 “Optimization of bioavailability of vitamin D under its deficiency and by the use of different calcium containing substances” of SPSR “Chemical technologies and materials”.

Канфлікт інтарэсаў. Аўтары заяўляюць аб адсутнасці канфлікту інтарэсаў.

Спіс выкарыстаных крыніц

1. Wolf, G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus / G. Wolf // *J. of Nutrition*. – 2004. – Vol. 134, N 6. – P. 1299–1302.
2. Громова, О. А. Вітамін D – смена парадигмы / О. А. Громова, И. Ю. Торшин. – М. : Торус Пресс, 2015. – 464 с.
3. Vitamin D: a pleiotropic hormone / A. Verstuyf [et al.] // *Kidney Int*. – 2010. – Vol. 78, N 2. – P. 140–145.
4. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states / M. R. Haussler [et al.] // *J. Endocrinol*. – 1997. – Vol. 154, suppl. – P. 57–73.
5. Lundqvist, J. Vitamin D as a regulator of steroidogenic enzymes / J. Lundqvist // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2010. – Vol. 1801, N 9. – P. 1056–1062.
6. Khanal, R. Membrane receptors for vitamin D metabolites / R. Khanal, I. Nemere // *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr*. – 2007. – Vol. 17, N 1. – P. 31–47.
7. Wang, Y. Where is the vitamin D receptor? / Y. Wang, J. Zhu, H. F. DeLuca // *Arch. Biochem. Biophys*. – 2012. – Vol. 523, N 1. – P. 123–133.
8. Focus on vitamin D and the adrenal gland / G. Muscogiuri [et al.] // *Horm. Metab. Res*. – 2015. – Vol. 47, N 4. – P. 239–246.
9. Vitamin D increases expression of the tyrosine hydroxylase gene in adrenal medullary cells / E. Puchacz [et al.] // *Brain Res. Mol. Brain Res*. – 1996. – Vol. 36, N 1. – P. 193–196.
10. Vitamin D₃-induced proliferative lesions in the rat adrenal medulla / A. S. Tischler [et al.] // *Toxicol. Sci*. – 1999. – Vol. 51, N 1. – P. 9–18.
11. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during and after steroid therapy: recent data and critical review / B. Goichot [et al.] // *Ann. Endocrinol. (Paris)*. – 2000. – Vol. 61, N 5. – P. 452–458.
12. Glucocorticoids decrease vitamin D receptor number and gene expression in human osteosarcoma cells / M. Godschalk [et al.] // *J. Bone Miner. Res*. – 1992. – Vol. 7, N 1. – P. 21–27.

13. Яглова, Н. В. Структурные и функциональные изменения мозгового вещества надпочечников крыс в пубертатном периоде, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана в пренатальном и постнатальном этапах развития / Н. В. Яглова, Д. А. Цомартова, В. В. Яглов // *Международ. науч.-исслед. журн.* – 2016. – № 8. – Ч. 2. – С. 34–36.
14. Kreiner, E. Weight and shape of the humanadrenalmedulla in various age groups / E. Kreiner // *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* – 1982. – Vol. 397 (1). – P. 7–15.
15. Advanced glycosylation end products in adrenal lipofuscin / I. Shimokawa [et al.] // *J. Gerontol. Series A. Biol. Sci. Med. Sci.* – 1998. – Vol. 53, N 1. – P. B49–B51.
16. Terman, A. Lipofuscin / A. Terman, U. T. Brunk // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 36, N 8. – P. 1400–1404.
17. Ward, J.M. Morphological and histochemical characteristics of pigments in aging F344 rats / J.M. Ward, H. Reznik-Schuller // *Vet. Pathol.* – 1980. – Vol. 17, N 6. – P. 678–685.
18. Macrophages within the human adrenal gland // J.A. González-Hernández [et al.] / *Cell Tissue Res.* – 1994. – Vol. 278, N 2. – P. 201–205.
19. Ford, J.K. Cell proliferation and displacement in the adrenal cortex of young rats injected with tritiated thymidine / J.K. Ford, R. W. Young // *Anat. Record.* – 1963. – Vol. 146, N 2. – P. 125–137.
20. Mitani, F. Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance / F. Mitani // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* – 2014. – Vol. 90 (5). – P. 163–183.

References

1. Wolf G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *The Journal of Nutrition*, 2004, vol. 134, no. 6, pp. 1299–1302.
2. Gromova O., Torshin I. *Vitamin D – the shift of paradigm*. Moscow, Torus Press Publ., 2015. 464 p. (in Russian).
3. Verstuyf A., Carmeliet G., Bouillon R., Mathieu Ch. Vitamin D: a pleiotropichormone. *Kidney International*, 2010, vol. 78, no. 2, pp. 140–145. DOI: 10.1038/ki.2010.17
4. Haussler M. R., Haussler C. A., Jurutka P. W., Thompson P. D., Hsieh J. C., Remus L. S., Selznick S. H., Whitfield G. K. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *Journal of Endocrinology*, 1997, vol. 154, suppl., pp. S57–S73.
5. Lundqvist J. Vitamin D as a regulator of steroidogenic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, vol. 1801, no. 9, pp. 1056–1062.
6. Khanal R., Nemere I. Membrane receptors for vitamin D metabolites. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2007, vol. 17, no. 1, pp. 31–47.
7. Wang Y., Zhu J., DeLuca H. F. Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, vol. 523, no. 1, pp. 123–133. DOI: 10.1016/j.abb.2012.04.001
8. Muscogiuri G., Altieri B., Penna-Martinez M., Badenhop K. Focus on vitamin D and the adrenal gland. *Hormone and Metabolic Research*, 2015, vol. 47, no. 4, pp. 239–246. DOI: 10.1055/s-0034–1396893
9. Puchacz E., Stumpf W. E., Stachowiak E. K., Stachowiak M. K. Vitamin D increases expression of the tyrosine hydroxylase gene in adrenal medullary cells. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 1996, vol. 36, no. 1, pp. 193–196. DOI: 10.1016/0169–328X(95)00314-I
10. Tischler A. S., Powers J. F., Pignatello M., Tsokas P., Downing J. C., McClain R. M. Vitamin D3-induced proliferative lesions in the rat adrenal medulla. *Journal of Toxicological Sciences*, 1999, vol. 51, no. 1, pp. 9–18.
11. Goichot B., Wicky C., Grunenberger F., Schlienger J. L. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during and after steroid therapy: recent data and critical review. *Annals of Endocrinology (Paris)*, 2000, vol. 61, no. 5, pp. 452–458.
12. Godschalk M., Levy J. R., Downs R. W. Glucocorticoids decrease vitamin D receptor number and gene expression in human osteosarcoma cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1992, vol. 7, no. 1, pp. 21–27.
13. Яглова Н. В., Цомартова Д. А., Яглов В. В. Altered structure and function of rat adrenal medulla in puberty after prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemical dichlorodiphenyltrichloroethane. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal [International Research Journal]*, 2016, vol. 8, part 2, pp. 34–36 (in Russian). DOI: 10.18454/IRJ.2016.50.098
14. Kreiner E. Weight and shape of the humanadrenalmedulla in various age groups. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.*, 1982, vol. 397, no. 1, pp. 7–15.
15. Shimokawa I., Higami Y., Horiuchi S., Iwasaki M., Ikeda T. Advanced glycosylation end products in adrenal lipofuscin. *The Journals of Gerontology. Series A. Biological Sciences and Medical Sciences*, 1998, vol. 53, no. 1, pp. B49–B51.
16. Terman A., Brunk U. T. Lipofuscin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, vol. 36, no. 8, pp. 1400–1404.
17. Ward J. M., Reznik-Schuller H. Morphological and histochemical characteristics of pigments in aging F344 rats. *Veterinary Pathology*, 1980, vol. 17, no. 6, pp. 678–685.
18. González-Hernández J. A., Bjrnstein Ehrhart-Bjrnstein S. R. M., Geschwend J. E., Adler G., Scherbaum W. A. Macrophages within the human adrenal gland. *Cell and Tissue Research*, 1994, vol. 278, no. 2, pp. 201–205.
19. Ford J. K., Young R. W. Cell proliferation and displacement in the adrenal cortex of young rats injected with tritiated thymidine. *The Anatomical Record*, 1963, vol. 146, no. 2, pp. 125–137. DOI: 10.1002/ar.1091460206
20. Mitani F. Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 2014, vol. 90, no. 5, pp. 163–183. DOI: 10.2183/pjab.90.163

Информация об авторах

Островский Александр Александрович – д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: astrowski@gmail.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.

Максимчик Юрий Зигмундович – мл. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: yurijmaks@yahoo.com.

Островская Оксана Борисовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: astrowskaja@gmail.com.

Орехов Сергей Дмитриевич – канд. мед. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: arekhau57@gmail.com.

Мойсеёнок Андрей Георгиевич – член-корреспондент, 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.

Information about the authors

Alexander A. Astrowski – D. Sc. (Med.), Professor, Leading researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, BLK, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: astrowski@gmail.com.

Valery A. Gurynovich – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, BLK, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: val@bioch.basnet.by.

Yury Z. Maksimchyk – Researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, BLK, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: val@bioch.basnet.by.

Aksana B. Astrowskaya – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: astrowskaja@gmail.com.

Sergey D. Arekhau – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus (80, Gorky Str., 230009, Republic of Belarus). E-mail: arekhau57@gmail.com.

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

Н. П. Митьковская, Е. Б. Петрова

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

АБДОМИНАЛЬНОЕ ОЖИРЕНИЕ В ФОРМИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО КРУПНООЧАГОВОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

Аннотация. В XXI в. проблема хронической сердечной недостаточности (ХСН) приобрела глобальный социально-экономический характер. Ассоциированные с ней заболевания сердечно-сосудистой системы, часто протекающие на фоне метаболических нарушений, вносят основной вклад в структуру инвалидизации и общей смертности в Европе и Республике Беларусь. Одним из аспектов, влияющих на продолжительность и сохранение качества жизни после перенесенного крупноочагового инфаркта миокарда (ИМ), является структурно-функциональное состояние левого желудочка (ЛЖ).

Цель исследования – оценить влияние абдоминального ожирения (АО) на структурно-функциональные характеристики ЛЖ у пациентов с острым крупноочаговым ИМ, формирование постинфарктного ремоделирования ЛЖ по дезадаптивному типу, развитие ХСН.

Обследован 91 пациент в возрасте от 40 до 63 лет с острым крупноочаговым ИМ: 75 (82,4 %) мужчин, 16 (17,6 %) женщин. Из них на основании антропометрических данных в состав основной группы отобрано 60 лиц с АО, в группу сравнения – 31 пациент без АО. У пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и АО через 12 мес. наблюдения доля лиц с формированием дезадаптивного типа ремоделирования ЛЖ составила 75,0 % против 9,7 % в группе пациентов без АО ($F = 0,399$; $p < 0,001$). Формирование в постинфарктном периоде через 12 мес. наблюдения дезадаптивного типа ремоделирования ЛЖ у лиц с АО сопровождалось толерантностью к физической нагрузке по результатам велоэргометрического теста и теста с 6-минутной ходьбой, увеличением функционального класса ХСН; через 36 мес. – увеличением доли умерших от сердечно-сосудистых причин.

Ключевые слова: постинфарктный кардиосклероз, абдоминальное ожирение, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, ремоделирование миокарда, толерантность к физической нагрузке

Для цитирования: Митьковская, Н. П. Абдоминальное ожирение в формировании хронической сердечной недостаточности после перенесенного крупноочагового инфаркта миокарда / Н. П. Митьковская, Е. Б. Петрова // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 86–92.

N. P. Mitkovskaya, E. B. Petrova

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

ABDOMINAL OBESITY IN THE DEVELOPMENT OF CHRONIC HEART FAILURE AFTER MYOCARDIAL INFARCTION

Abstract. In XXI century the problem of chronic heart failure (CHF) acquired a global socio-economic character. The cardiovascular diseases leading to the development of CHF often occur on the background of metabolic disorders, make a major contribution to the structure of disability and overall mortality in Europe and the Republic of Belarus. One of the conditions that determine a duration and quality of life after myocardial infarction (MI) is concerned with the structural and functional characteristics of the left ventricular (LV).

The objective of the present research was to estimate the influence of abdominal obesity (AO) on some structural and functional characteristics of LV, as well as the development of maladaptive-type LV remodeling and the progression of chronic heart failure in patients after MI.

We examined 91 patient aged from 40 to 63 after MI: 82.4 % – men, 17.6 % – women. Sixty patients with postinfarction cardiosclerosis and AO were included into one group, 31 patients without AO – into another group. After 12 months of follow-up, the proportion of patients with postinfarction cardiosclerosis and AO who developed maladaptive prognostically unfavorable types of postinfarction LV remodeling made up 75.0 % vs. 9.7 % of patients without AO ($F = 0.399$; $p < 0.001$). The development of the maladaptive type of postinfarction LV remodeling after 12 months was accompanied by a decrease in myocardial LV contractility, low exercise tolerance as a result of cycloergometric exercise and a six-minute walking test, as well as by an increase in the functional class of CHF and in the number of the deceased among the patients with obesity.

Keywords: postinfarction cardiosclerosis, abdominal obesity, myocardial infarction, heart failure, myocardial remodeling, exercise capacity

For citation: Mitkovskaya N. P., Petrova E. B. Abdominal obesity in the development of chronic heart failure after myocardial infarction. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 86–92 (in Russian).

Введение. В XXI в. проблема хронической сердечной недостаточности (ХСН) приобрела глобальный социально-экономический характер. Актуальность ее обусловлена прогрессирующим за последние 10–15 лет увеличением числа пациентов с ХСН, ростом числа госпитализаций (в том числе повторных), инвалидизацией и высокой смертностью данной категории лиц. В развитых странах сердечная недостаточность наблюдается примерно у 1–2 % взрослой популяции. У лиц старше 55 лет риск развития сердечной недостаточности в течение оставшейся жизни составляет более 33 % у мужчин и 28 % у женщин. В экономически развитых странах среди лиц старше 75 лет ХСН выявляется более чем у 10 % населения. В течение года умирает около 17 % госпитализированных в стационар и более 7 % амбулаторных пациентов, страдающих ХСН, а в структуре смертности преобладают лица с ее прогрессирующим течением. Частые госпитализации, ранняя инвалидизация и смертность населения, дополнительные затраты здравоохранения на лечение вследствие прогрессирования ХСН ставят сердечную недостаточность в ряд пока не решенных глобальных социально-экономических проблем [1].

Ассоциированные с ХСН заболевания сердечно-сосудистой системы, часто протекающие на фоне метаболических нарушений, вносят основной вклад в структуру инвалидизации и общей смертности в Европе и Республике Беларусь. Одним из аспектов, влияющих на продолжительность и сохранение качества жизни после перенесенного крупноочагового инфаркта миокарда (ИМ), считается структурно-функциональное состояние левого желудочка (ЛЖ). Морфологическим субстратом постинфарктного изменения ЛЖ являются происходящие на всех уровнях структурной организации сердца процессы, ассоциированные с его дилатацией, изменением формы и толщины стенок. Постинфарктное ремоделирование ЛЖ у большинства пациентов должно носить компенсаторный характер и быть направлено на поддержание сердечного выброса. Данные преобразования в ряде случаев приобретают декомпенсированную направленность и являются ключевым моментом в патогенезе ишемической кардиомиопатии, развитии и быстром прогрессировании ХСН [2–4].

Цель исследования – оценить влияние абдоминального ожирения (АО) на структурно-функциональные характеристики левого желудочка у пациентов с острым крупноочаговым инфарктом миокарда, формирование постинфарктного ремоделирования левого желудочка по дезадаптивному типу, развитие хронической сердечной недостаточности.

Материалы и методы исследования. Согласно выбранному критерию включения (индексированный впервые крупноочаговый ИМ), участниками проспективного, динамического, сравнительного исследования стал 91 пациент в возрасте от 40 до 63 лет. Распределение лиц по полу было следующим: 82,4 % ($n = 75$) составили мужчины, 17,6 % ($n = 16$) – женщины. Наблюдение за пациентами осуществлялось на протяжении 3 лет.

При формировании групп наблюдения были проанализированы амбулаторные карты и стационарные истории болезни пациентов, собраны анамнестические данные, проведен клинический осмотр, выполнены антропометрические измерения, запись ЭКГ покоя, эхокардиографическое исследование (Эхо-КГ) и лабораторные тесты.

Диагностику крупноочагового ИМ проводили согласно разработанным в 2000 г. экспертами Европейского общества кардиологов (ESC) и Американской коллегии кардиологов (ACC) критериям, включающим типичную динамику повышения и снижения концентрации биохимических маркеров некроза миокарда (Тропонина и/или КФК-МВ) в сочетании с клинической составляющей острой ишемии миокарда, если исходные данные или изменения ЭКГ в динамике включали формирование патологических зубцов Q [5]. Критериями исключения пациентов из исследования были: патологически измененные на момент включения в исследование размеры ЛЖ по данным Эхо-КГ; некоронарогенные заболевания миокарда; врожденные и приобретенные клапанные пороки сердца; перенесенное в прошлом или выполненное в процессе наблюдения кардиохирургическое или интервенционное вмешательство; применение имплантируемых антиаритмических устройств, обеспечивающих постоянную электрокардиостимуляцию; наличие некорректируемой медикаментозной тахиаритмии; ИМ в анамнезе; заболевания верхних и нижних

дыхательных путей, сопровождающиеся гиповентиляцией; прогрессирующие заболевания печени и почек; онкологическая патология; инвалидизирующая психиатрическая патология; употребление психоактивных веществ.

С учетом основных антропометрических критериев (вес, рост, индекс массы тела (ИМТ), окружность талии (ОТ), окружность бедер (ОБ), отношение ОТ/ОБ) проведена диагностика абдоминального типа ожирения обследуемых, по результатам которой получены следующие показатели: у мужчин – ИМТ > 30,0 кг/м², ОТ > 94 см, ОТ/ОБ > 0,9; у женщин – ИМТ > 30,0 кг/м², ОТ > 80 см, ОТ/ОБ > 0,85 [6, 7]. В состав основной группы вошли 60 пациентов (48 мужчин и 12 женщин) с постинфарктным кардиосклерозом и АО, в группу сравнения – 31 пациент (27 мужчин и 4 женщины) без избыточного веса и АО.

Сформированные группы были сопоставимы по локализации зоны инфаркта, реперфузионной тактике, медикаментозной терапии в постинфарктном периоде. Все включенные в настоящее исследование лица получали комплексную медикаментозную терапию согласно протоколу ведения пациентов, перенесших ИМ, включающую антитромботические средства (нефракционированный гепарин или низкомолекулярные гепарины – эноксапарин или фондапаринукс) на стационарном этапе ведения в острый период ИМ, антитромбоцитарную терапию (двойную антиагрегантную схему комбинации аспирина и клопидогреля), ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), β -блокаторы, статины. Введение наркотических анальгетиков выполнялось при наличии показаний и по времени ограничивалось первыми сутками ИМ.

В качестве ключевых точек динамического наблюдения были выбраны: острый период ИМ (10 \pm 2 дня), 1-й (30 \pm 2 дня), 6-й (180 \pm 2 дня) и 12-й (364 \pm 2 дня) месяцы постинфарктного кардиосклероза. Дополнительно для выявления повторных коронарных событий у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом через 36 мес. от начала заболевания были собраны сведения о состоянии здоровья.

Эхо-КГ пациентам обеих групп выполняли на аппарате Vivid-7 фирмы General Electric Medical Systems (США) в трех режимах (М-, В-модальном и цветном доплеровском) с использованием ультразвукового датчика 3,5 МГц по стандартной методике с допустимой погрешностью измерений 2, 5, 4–10 % соответственно. Ремоделирование ЛЖ на момент рандомизации рассматривалось как критерий исключения для лиц обеих групп. Для определения функционального класса ХСН согласно классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA) и оценки толерантности к физической нагрузке использовали тест с 6-минутной ходьбой. Реадаптацию к физической нагрузке оценивали в динамике по критерию минимального достоверного улучшения результата – увеличения пройденной в течение 6 мин дистанции на 70 м по сравнению с исходными данными, полученными на 10-й (\pm 2) день ИМ. Концентрацию предшественника мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) и лептина определяли на 30-й (\pm 2) день постинфарктного периода *in vitro* методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов фирмы DRG International, Inc. (США) [7–10]. Обработку полученных данных осуществляли с помощью статистических пакетов программ Excel и Statistica (версия 10.0, StatSoft, Inc., США). Полученные данные интерпретировали как достоверные, а различия между показателями считали значимыми при величине безошибочного прогноза, равной 95 % и более ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Через 36 мес. после ИМ в группе лиц с АО доля умерших от сердечно-сосудистых причин составила 15 % ($n = 9$), в группе лиц без АО эпизодов смерти не зарегистрировано ($F = 0,057$; $p < 0,05$). Из имевших место случаев смерти пациентов 2,2 % ($n = 2$) умерли в течение первого года после ИМ. В структуре кардиоваскулярной смертности за 36 мес. постинфарктного наблюдения преобладала доля лиц с декомпенсацией ХСН – 77,8 % ($n = 7$) случаев, с острой коронарной недостаточностью – 22,2 % ($n = 2$) ($p < 0,05$).

Содержание лептина в группе пациентов с АО превышала соответствующие значения в группе лиц без АО – 12,0 (8,2–25,8) нг/мл против 3,2 (2,0–5,2) нг/мл ($U = 40,0$; $p < 0,001$), а доля лиц с гиперлептинемией составила 100 % ($n = 50$) против 20 % ($n = 6$) ($F = 0,7$; $p < 0,001$) соответственно. В группе пациентов с АО уровень NT-proBNP составил 151,5 (128,0–201,0) нг/л против 121,5 (115,0–131,0) нг/л в группе лиц без АО ($U = 188,0$; $p < 0,001$), а доля лиц с концентрацией пептида более 125 нг/л – 76,7 % ($n = 23$) против 26,7 % ($n = 8$) ($\chi^2 = 15,0$; $p < 0,001$).

Значимых межгрупповых эхокардиографических различий в острый период ИМ получено не было. Несмотря на наблюдавшиеся в течение года постинфарктного периода у пациентов обеих групп изменения геометрических параметров ЛЖ, в группе лиц с АО абсолютный прирост ряда эхокардиографических характеристик ЛЖ был выше, а ремоделирование приобрело патологическую направленность. Через 12 мес. после ИМ наблюдалась бóльшая выраженность процессов дилатации ЛЖ у пациентов с АО согласно величинам конечного систолического и диастолического индексов ($41,2 \pm 1,47$ мл/м² против $29,2 \pm 2,56$ мл/м² и $74,7 \pm 1,94$ мл/м² против $66,0 \pm 2,48$ мл/м²; $p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно), индекса массы миокарда ЛЖ (ИММ ЛЖ) ($149,8 \pm 3,13$ г/м² против $132,4 \pm 2,4$ г/м²; $p < 0,01$), индекса сферичности в диастолу (ИСд) ($0,86 \pm 0,01$ против $0,77 \pm 0,01$; $p < 0,001$).

Межгрупповой анализ одной из ведущих геометрических характеристик формы ЛЖ [11] – ИСд продемонстрировал в группе пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и АО статистически значимо более высокие значения через 1, 6 и 12 мес. наблюдения ($p < 0,001$): $0,77 \pm 0,01$ против $0,72 \pm 0,01$; $0,82 \pm 0,01$ против $0,74 \pm 0,01$ и $0,86 \pm 0,01$ против $0,77 \pm 0,01$ в группе сравнения соответственно. Анализ годовой динамики выявил статистически значимую тенденцию роста показателя степени сферификации ЛЖ у пациентов обеих групп: от $0,71 \pm 0,01$ до $0,77 \pm 0,01$; $0,82 \pm 0,01$ и $0,86 \pm 0,01$ ($\chi^2 = 72,1$; $p < 0,001$) в группе с АО и от $0,71 \pm 0,01$ до $0,72 \pm 0,01$; $0,74 \pm 0,01$ и $0,77 \pm 0,01$ ($\chi^2 = 19,0$; $p < 0,001$) в группе сравнения. Вместе с тем абсолютный прирост ИСд за 12 мес. наблюдения в группе с АО был статистически значимо больше ($0,15 \pm 0,01$ против $0,05 \pm 0,01$ в группе сравнения, $p < 0,001$) (рис. 1).

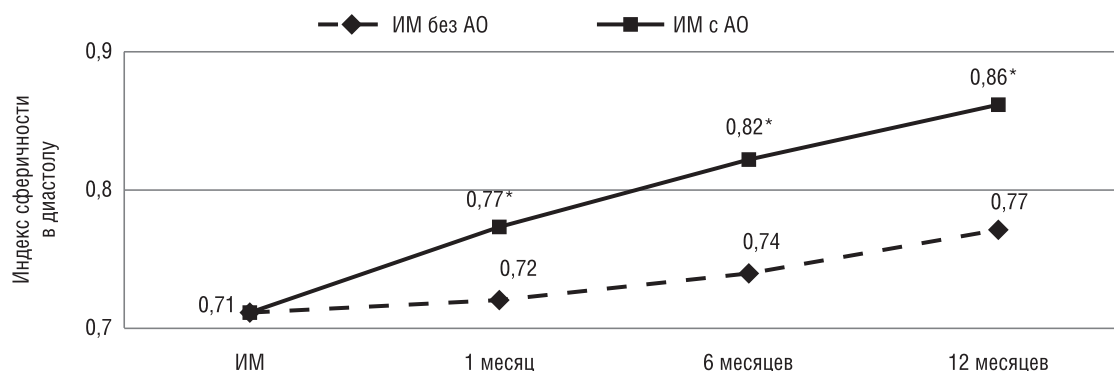


Рис. 1. Индекс сферичности в диастолу у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом. * – достоверность различия показателей ($p < 0,001$) при сравнении с группой пациентов с ИМ без АО

Fig. 1. Diastole sphericity index of patients with postinfarction cardiosclerosis. * – index difference reliability ($p < 0,001$) in comparison to the group of patients with IM without AO

В зависимости от выраженности изменения геометрии ЛЖ (наличие двух или трех патологических критериев ремоделирования – гипертрофии миокарда по данным ИММ ЛЖ, индекса относительной толщины стенок левого желудочка в диастолу менее 0,33 или более 0,45 и ИСд более 0,8) диагностировали прогностически неблагоприятный дезадаптивный тип постинфарктного ремоделирования ЛЖ [11], ассоциированного, по данным литературы, со снижением сократительной способности миокарда, качества и продолжительности жизни пациентов. Удельный вес лиц с формированием дезадаптивного типа постинфарктного ремоделирования ЛЖ в группе пациентов с АО составил 75,0 % ($n = 39$) против 9,7 % ($n = 3$) в группе лиц без АО ($F = 0,399$; $p < 0,001$) (рис. 2).

В группе пациентов с АО в сравнении с лицами без АО через 6 и 12 мес. постинфарктного периода значения показателей фракции выброса (ФВ) ЛЖ были ниже ($51,6 \pm 1,51$ % против $58,0 \pm 1,58$ % и $45,1 \pm 1,30$ % против $58,9 \pm 1,66$ %; $p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно). У пациентов с АО удельный вес лиц с систолической дисфункцией ЛЖ (ФВ ЛЖ < 50 %) через 12 мес. наблюдения превышал аналогичный показатель в группе без АО и составил 78,8 % ($n = 41$) против 19,4 % ($n = 6$) ($\chi^2 = 28,0$; $p < 0,001$).

В группе пациентов с АО через 12 мес. наблюдения фиксировались статистически значимо более низкие среднегрупповые значения сердечного индекса: 2155,5 (1667,5–2363,5) против 2461,5 (2033,0–2833,0) в группе сравнения ($U = 436,5$; $p < 0,001$).

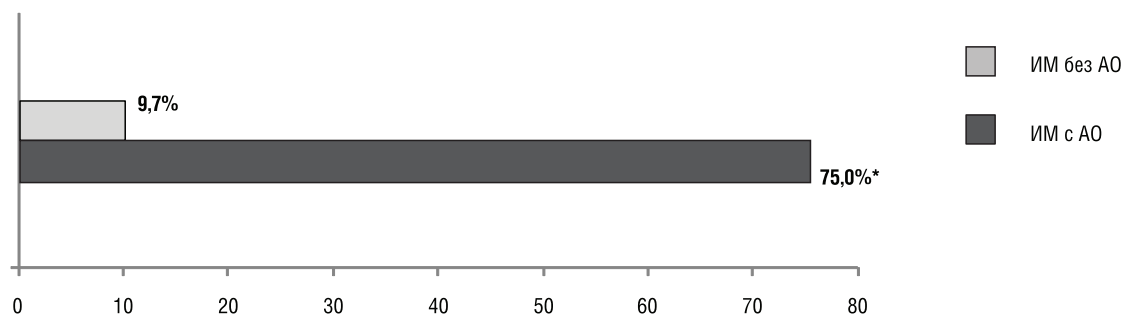


Рис. 2. Удельный вес лиц с дезадаптивным типом ремоделирования ЛЖ через 12 мес. после ИМ. * – достоверность различия показателей ($p < 0,001$) при сравнении с группой пациентов с ИМ без АО

Fig. 2. Proportion of persons with desadaptive-type LR remodeling in 12 months after IM. * – index difference reliability ($p < 0.001$) in comparison to the group of patients with IM without AO

Сравнительный межгрупповой анализ показателя, отражающего зависимость систолической функции ЛЖ от его формы (интегральный систолический индекс ремоделирования – ИСИР), продемонстрировал у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и АО через 6 и 12 мес. наблюдения значимо более низкие значения ($64,1 \pm 2,98$ против $78,8 \pm 2,89$ и $66,5 \pm 2,98$ против $76,7 \pm 2,95$; $p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно). Сравнительный внутригрупповой анализ ИСИР за 12 мес. постинфарктного периода выявил статистически значимую тенденцию к снижению данного показателя у пациентов с АО (с $84,1 \pm 2,37$ до $76,0 \pm 1,81$; $64,1 \pm 2,98$ и $66,5 \pm 2,98$ ($\chi^2 = 43,5$; $p < 0,001$), а показатель отрицательного прироста составил $-28,7$ ($-43,3 \dots -17,0$). В группе лиц без АО за 12 мес. снижение указанного показателя было недостоверным.

Через 12 мес. после ИМ у пациентов с АО, согласно классификации NYHA, преобладал ФК III: $59,6\%$ ($n = 31$) против $6,4\%$ ($n = 2$) у лиц без АО ($F = 0,180$; $p < 0,001$). В группе пациентов без АО преобладали I и II ФК сердечной недостаточности по NYHA: $9,7\%$ ($n = 3$) против $0,0\%$ ($n = 0$) ($F = 0,063$; $p < 0,05$) и $83,9\%$ ($n = 26$) против $40,4\%$ ($n = 21$) со II ($\chi^2 = 14,95$; $p < 0,001$) у лиц с АО.

В группе без АО был выше удельный вес лиц, продемонстрировавших при выполнении теста с 6-минутной ходьбой прирост толерантности к физической нагрузке через 1, 6 и 12 мес. после ИМ: $64,5\%$ ($n = 20$) против $23,3\%$ ($n = 14$) ($\chi^2 = 14,8$; $p < 0,001$), $83,9\%$ ($n = 26$) против $35,1\%$ ($n = 20$) ($\chi^2 = 19,2$; $p < 0,001$) и $87,1\%$ ($n = 27$) против $50,0\%$ ($n = 26$) ($\chi^2 = 11,6$; $p < 0,001$) пациентов с АО соответственно (рис. 3).

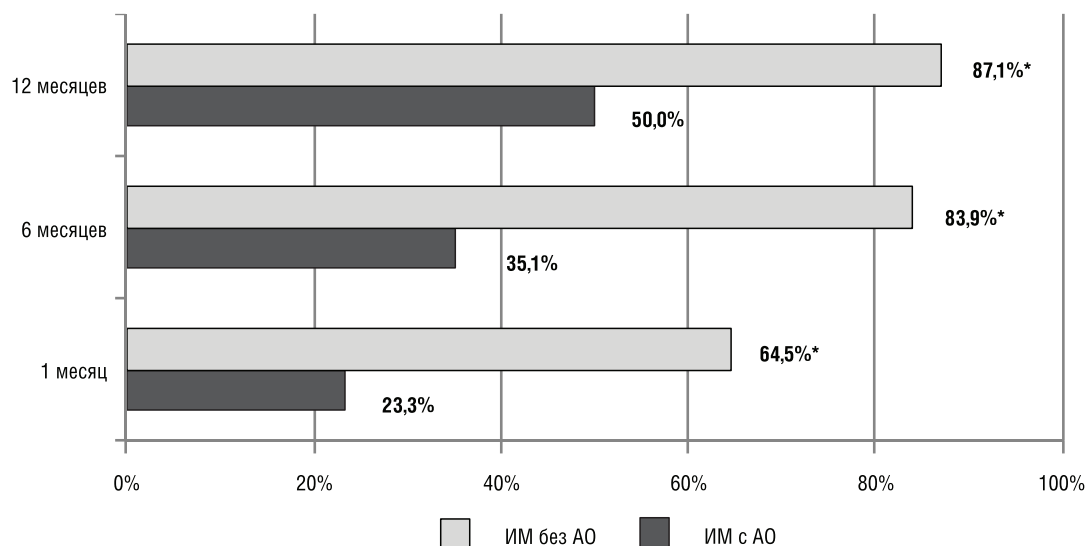


Рис. 3. Доля лиц, продемонстрировавших в постинфарктном периоде прирост толерантности к физической нагрузке при выполнении теста с 6-минутной ходьбой. * – достоверность различия показателей ($p < 0,001$) при сравнении с группой пациентов с ИМ и АО

Fig. 3. Proportion of persons who demonstrated an increase in tolerance to physical exercises during the postinfarction period in a 6 min walking test. * – index difference reliability ($p < 0001$) in comparison to the group of patients with IM and AO

Выявлены прямая, средней силы связь между ИМТ и ремоделированием ЛЖ по дезадаптивному типу ($r = 0,45$; $p < 0,001$); обратная, средней силы связь между ИМТ и ФВ ЛЖ ($r = -0,36$; $p < 0,001$) через 12 мес. после ИМ; обратная, средней силы связь между полученными через 12 мес. после ИМ данными теста с 6-минутной ходьбой и формированием патологического ремоделирования ЛЖ ($r = -0,48$; $p < 0,001$), ФВ ЛЖ ($r = -0,50$; $p < 0,001$); прямая, средней силы связь между содержанием лептина и уровнем NT-proBNP ($r = 0,53$; $p < 0,001$). Установлена прямая, средней силы связь между NT-proBNP и развитием через 12 мес. после ИМ ремоделирования ЛЖ по дезадаптивному типу ($r = 0,42$; $p < 0,01$), смертью от кардиологических причин в течение ближайших 3 лет ($r = 0,43$; $p < 0,001$).

Заключение. У лиц с абдоминальным ожирением в сравнении с пациентами без абдоминального ожирения через 12 мес. после перенесенного острого крупноочагового инфаркта миокарда преобладал дезадаптивный тип ремоделирования левого желудочка, ассоциированный с нарушением его систолической функции, низкой переносимостью физической нагрузки, развитием высокого функционального класса хронической сердечной недостаточности; через 36 мес. отмечалось увеличение доли умерших от декомпенсации хронической сердечной недостаточности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Лопатин, Ю. М. Рекомендации ESC по диагностике и лечению острой и хронической сердечной недостаточности 2016 // Рос. кардиол. журн. – 2017. – № 1. – С. 7–81.
2. Постинфарктное ремоделирование левого желудочка: некоторые патогенетические аспекты / Е. Б. Петрова [и др.] // Воен. медицина. – 2015. – № 1. – С. 116–122.
3. Tilg, H. Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases / H. Tilg, A. R. Moschen // Clin. Sci. (Lond.). – 2008. – Vol. 114, N 4. – P. 275–288.
4. Постинфарктный кардиосклероз на фоне висцерального типа ожирения / Е. Б. Петрова [и др.] // Кардиология в Беларуси. – 2015. – № 3. – С. 46–66.
5. Диагностика и лечение острых коронарных синдромов с подъемом и без подъема сегмента ST на ЭКГ : нац. рек. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр «Кардиология», Белорус. науч. о-во кардиологов ; рабочая группа по подгот. рек. : Л. З. Полонецкий, В. П. Подпалов, И. В. Корнелиук, В. В. Мирончик, В. В. Стельмашонок, О. Л. Полонецкий. – Минск, 2010. – 64 с.
6. Prevention of overweight/obesity as a strategy to optimize cardiovascular health / M. A. Cornier [et al.] // Circulation. – 2011. – Vol. 124, N 7. – P. 840–850.
7. Митьковская, Н. П. Секреторная активность жировой ткани при поражении коронарных артерий у лиц с метаболическим синдромом / Н. П. Митьковская, Е. А. Григоренко, Л. В. Картун // Мед. журн. – 2008. – № 4. – С. 43–46.
8. Kershaw, E. E. Adipose tissue as an endocrine organ / E. E. Kershaw, J. S. Flier // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2004. – Vol. 89, N 6. – P. 2548–2556.
9. Relation of Increased Leptin Concentrations to History of Myocardial Infarction and Stroke in the United States Population / J. Sierra-Johnson [et al.] // Am. J. Cardiol. – 2007. – Vol. 100, N 2. – P. 234–239.
10. N-terminal pro brain natriuretic peptide in the management of patients in the medical emergency department (PROMPT): correlation with disease severity, utilization of hospital resources, and prognosis in a large, prospective, randomized multicentre trial / A. Luchner [et al.] // Eur. J. Heart Fail. – 2012. – Vol. 14, N 3. – P. 259–267.
11. Оценка ремоделирования левого желудочка : учеб. пособие для врачей / Л. А. Бокерия [и др.] / Науч. центр серд.-сосуд. хирургии им. А. Н. Бакулева Рос. акад. мед. наук ; Моск. гос. мед.-стоматол. ун-т. – М. : Науч. центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева Рос. акад. мед. наук, 2009. – 36 с.

References

1. Lopatin Yu. M. The recommendations of the ESC for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2016. *Rossiiskii kardiologicheskii zhurnal* [Russian Journal of Cardiology], 2017, no. 1, pp. 7–81 (in Russian). DOI: 10.15829/1560-4071-2017-1-7-81
2. Petrova E. B., Statkevich T. V., Ponomarenko I. N., Mitkovskaya N. P. Left ventricular remodeling due to myocardial infarction: some pathogenetic aspects. *Voennaya meditsina* [Military Medicine], 2015, no. 1, pp. 116–122 (in Russian).
3. Tilg H., Moschen A. R. Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clinical Science*, 2008, vol. 114, no. 4, pp. 275–288. DOI: 10.1042/CS20070196
4. Petrova E. B., Mit'kovskaya N. P., Statkevich T. V., Kartun L. V. Myocardial infarction on a background of visceral fat type obesity. *Kardiologiya v Belarusi* [Cardiology in Belarus], 2015, no. 3, pp. 46–66 (in Russian).
5. Polonetskii L. Z., Podpalov V. P., Korneliuk I. V., Mironchik V. V., Stel'mashonok V. V., Polonetskii O. L. *Diagnosis and treatment of acute coronary syndromes with ascent and without lift in ST segment on ECG: national recommendations*. Minsk, 2010. 64 p. (in Russian).

6. Cornier M. A., Marshall J. A., Hill J. O., Maahs D. M., Eckel R. H. Prevention of overweight/obesity as a strategy to optimize cardiovascular health. *Circulation*, 2011, vol. 124, no. 7, pp. 840–850. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.968461
7. Mit'kovskaya N. P., Grigorenko E. A., Kartun L. V. The secretory activity of adipose tissue in the coronary artery disease in patients with metabolic syndrome. *Meditsinskii zhurnal* [Medical Journal], 2008, no. 4, pp. 43–46 (in Russian).
8. Kershaw E. E., Flier J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004, vol. 89, no. 6, pp. 2548–2556. DOI: 10.1210/jc.2004–0395
9. Sierra-Johnson J., Romero-Corral A., Lopez-Jimenez F., Gami A. S., Sert Kuniyoshi F. H., Wolk R., Somers V. K. Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the united states population. *American Journal of Cardiology*, 2007, vol. 100, no. 2, pp. 234–239. DOI: 10.1016/j.amjcard.2007.02.088
10. Luchner A., Möckel M., Spanuth E., Möcks J., Peetz D., Baum H., Spes C., Wrede C.E., Vollert J., Müller R., Katus H., Giannitsis E. N-terminal pro brain natriuretic peptide in the management of patients in the medical emergency department (PROMPT): correlation with disease severity, utilization of hospital resources, and prognosis in a large, prospective, randomized multicentre trial. *European Journal of Heart Failure*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 259–267. DOI: 10.1093/eurjhf/hfr171
11. Bokeriia L. A., Bokeriia O. L., Averina I. I., Berseneva M. I. *Assessment of left ventricular remodeling: a textbook for doctors*. Moscow, Nauchnyi tsentr serdechno-sosudistoi khirurgii imeni A. N. Bakuleva Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk Publ., 2009. 36 p. (in Russian).

Информация об авторах

Митковская Наталья Павловна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mitkovskaya1@mail.ru.

Петрова Екатерина Борисовна – канд. мед. наук, ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Katrin.sk-81@tut.by.

Information about the authors

Natalia P. Mitkovskaya – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mitkovskaya1@mail.ru.

Ekaterina B. Petrova – Ph. D. (Med.), Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Katrin.sk-81@tut.by.

Н. А. Корж¹, Ф. С. Леонтьева¹, В. Ю. Делевская², М. С. Хилько³

¹Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко НАМН Украины, Харьков, Украина

²Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

³Харьковское фармацевтическое предприятие «Здоровье народу», Харьков, Украина

РОЛЬ ОБЩИХ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ КОКСАРТРОЗА

Аннотация. Изучена динамика общих и специфических иммунологических показателей для определения иммунологических критериев прогрессирования коксартроза.

Обследовано 110 лиц с коксартрозом I–IV стадии. Средний возраст пациентов составил 64,2±2,0 года. В контрольную группу вошли 20 человек, сопоставимых по возрасту и полу с пациентами основной группы. Иммунологическое обследование включало определение CD3+, CD4+, CD8+, Т-активных лимфоцитов, иммуноглобулинов классов IgM, IgA и IgG, циркулирующих иммунных комплексов, аутоиммунных лимфоцитотоксических и гранулоцитотоксических антител. Клеточно-специфическую сенсибилизацию к тканевым и бактериальным антигенам оценивали в реакции ингибирования миграции лейкоцитов. Использовали антигены костной ткани, хрящевой ткани, синовиальной оболочки и бактериальные антигены – *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.

У больных коксартрозом отмечается повышение содержания IgM, IgA, IgG и аутоиммунных лимфоцитотоксических антител наряду со снижением уровней CD3+, CD8+ и Т-активных лимфоцитов. Прогрессирование коксартроза сопровождается достоверным увеличением уровней IgM, IgA, IgG, что позволяет использовать их для контроля тяжести течения заболевания. Аутоиммунный ответ при коксартрозе характеризуется сенсибилизацией по гуморальному типу на антигены костной ткани, хрящевой ткани и синовиальной оболочки, однако прогрессирование заболевания сопровождается усилением сенсибилизации по клеточному типу в сторону торможения миграции лейкоцитов к антигенам хрящевой ткани и синовиальной оболочки. Микробная сенсибилизация у больных коксартрозом проявляется как ускорением, так и торможением миграции лейкоцитов на антигены *St. aureus* и *Str. pyogenes*, но при утяжелении заболевания наблюдается также превалирование гиперчувствительности по замедленному типу на бактериальные антигены.

Установлено, что основными проявлениями аутоиммунного ответа при коксартрозе являются усиление антителогенеза и проявление клеточной тканевой и бактериальной сенсибилизации на фоне дефицита Т-супрессорного звена клеточного иммунитета. При прогрессировании коксартроза наблюдается увеличение уровней IgM, IgA, IgG и аутоиммунных лимфоцитотоксических антител на фоне снижения содержания CD3+, CD8+ и Т-активных лимфоцитов. Реакция ингибирования миграции лейкоцитов позволяет следить за развитием заболевания по характеру и выраженности тканевой и бактериальной сенсибилизации. Так, смещение ускорения миграции лейкоцитов в сторону торможения на антигены хрящевой ткани, синовиальной оболочки и бактериальные антигены *Str. pyogenes* и *St. aureus* свидетельствует об увеличении активности деструктивных процессов в суставе и требует незамедлительной медицинской коррекции.

Ключевые слова: коксартроз, иммунологические критерии, бактериальная сенсибилизация, аутоиммунные реакции, тканевые антигены

Для цитирования: Роль общих и специфических иммунологических изменений в прогрессировании коксартроза / Н. А. Корж [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 93–101.

М. О. Korzh¹, F. S. Leontieva¹, V. Yu. Dielievskaya², M. S. Khilko³

¹Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

³“Zdorovye Narody”, LTD, Kharkiv, Ukraine

ROLE OF GENERAL AND SPECIFIC IMMUNOLOGICAL CHANGES IN THE PROGRESSION OF COXARTHROSIS

Abstract. The objective of this work was to identify immunological criteria for the progression of coxarthrosis on the basis of studying the dynamics of general and specific immunological indices.

110 patients with coxarthrosis of I–IV stages were examined. The average age was 64.2±2.0 years. The control group consisted of 20 persons comparable in age and sex to the main group. Immunological examination included the determination of CD3+, CD4+, CD8+, T active lymphocytes, IgM, IgA and IgG immunoglobulins, circulating immune complexes, auto-immune lymphocytotoxic and granulocytotoxic antibodies. Cell-specific sensitization to tissue and bacterial antigens was evaluated in the reaction of leukocyte migration inhibition assay (LMIA). Antigens of bone and cartilage tissue, synovial membrane and bacterial antigens – *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* were used.

In patients with coxarthrosis, an increase in the levels of IgM, IgA, IgG, autoimmune lymphocytotoxic antibodies and a decrease in CD3+, CD8+ and T active lymphocytes are observed. Progression of coxarthrosis is accompanied by a significant increase in the levels of IgM, IgA and IgG, which allows them to be used to control the severity of the disease course. Autoimmune response at coxarthrosis is characterized by humoral-type sensitization to bone and cartilage tissue and synovial membrane antigens, but progression of coxarthrosis leads to an increase in cell-type sensitization – towards the inhibition of leukocyte migration to cartilage tissue and synovial membrane antigens. Bacterial sensitization in coxarthrosis patients is revealed by both acceleration and inhibition of leukocyte migration to *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* antigens, but while the disease progression predominance of hypersensitivity to bacterial antigens by a delayed type is also observed.

The main features of autoimmune response at coxarthrosis are the hyperproduction of antibodies and the signs of cell tissue and bacterial sensitization along with a decrease in T-suppressor lymphocytes. Progression of coxarthrosis is accompanied by an increase in IgM, IgA, IgG and autoimmune lymphocytotoxic antibodies along with a decrease in CD3+, CD8+ and T active lymphocytes. Leukocyte migration inhibition assay allows one to control the disease course by the type and severity of tissue and bacterial sensitization. Thus, a shift of acceleration of leukocyte migration to the inhibition to cartilage tissue, synovial membrane antigens as well as bacterial antigens of *Str. Pyogenes* and *St. Aureus* indicates an intensification of destructive processes in the joint, which requires an immediate medical correction.

Keywords: coxarthrosis, immunological criteria, bacterial sensitization, autoimmune reactions, tissue antigens

For citation: Korzh M. O., Leontieva F. S., Dielievska V. Yu., Khilko M. S. Role of general and specific immunological changes in the progression of coxarthrosis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4. pp. 93–101 (in Russian).

Введение. Коксартроз составляет до 37,6 % от всех случаев инвалидности по причине поражения опорно-двигательной системы [1]. Дегенеративно-дистрофические процессы в тазобедренном суставе по мере утяжеления стадии заболевания сопровождаются закономерными общими и специфическими иммунологическими изменениями. Перестройка элементов синовиальной оболочки, гибель хондроцитов с вовлечением клеток субхондральной кости, утолщение промежуточной костной пластинки и поражение мягких тканей в суставе и вокруг него [2–4] свидетельствуют о необходимости контроля состояния соединительной ткани на микроуровне без применения инвазивных методов. Все большее внимание заслуживает использование методик, позволяющих определить индивидуальный специфический иммунный ответ на антигены соединительной ткани с целью выяснения варианта течения коксартроза – благоприятного или неблагоприятного [5].

В 1970-е годы Нильс Йерне, основатель теории иммунорегуляции, доказал, что в организме происходит постоянный синтез регуляторных аутоантител к собственным антигенам. В то же время Пьер Грабарь (1975) выдвинул предположение о «мусороуборочной» функции аутоантител. М. Н. Карпан (1962) обнаружил аутоантитела к ткани сердца при иммунизации стрептококком, показав возможность выработки аутоантител при иммунизации организма микробами, имеющими общие антигенные детерминанты с тканями. Подобный механизм был продемонстрирован и в отношении тканей желудочно-кишечного тракта и микробов кишечной группы [6].

Доказано наличие аутоиммунного ответа к антигенам тканей организма уже на ранних этапах развития заболевания в виде продукции аутоантител – как следствие патологического процесса, а потому определение аутоантител позволяет выделить группы риска среди пациентов по тому или иному заболеванию [7].

В качестве доказательств необходимости изучения состояния аутоиммунного ответа при различных заболеваниях можно привести следующие: внедрение иммунобиотехнологических методов оценки содержания аутоантител в практику медицинского освидетельствования призывников армии Израиля, внедрение компанией Bio-Rad по разрешению агентства FDA технологий одновременной оценки содержания 1200 аутоантител в сыворотке крови пациентов [8], использование в клинико-диагностической практике тест-систем ЭЛИ-тест, основанных на иммуноферментном анализе и позволяющих определять уровни аутоантител различной специфичности [9].

Таким образом, на сегодняшний день в медицинскую практику внедряются методы мультикомпонентной оценки состояния аутоиммунитета, позволяющие выявлять и анализировать изменения, происходящие в организме как при патологии, так и задолго до ее манифестации.

Однако наряду с образованием аутоантител в аутоиммунном ответе принимают участие клеточные механизмы, что обусловлено поликлональной активацией Т-лимфоцитов при воздействии микробных суперантигенов. Примером могут служить аутоиммунные осложнения при

Эпштейн–Барр вирусной инфекции. При этом использование наборов для ИФА по определению аутоантител не позволяет оценить степень вовлеченности аутоиммунного ответа по клеточному типу.

Как известно, аутоиммунитет ограничен многими регуляторными механизмами. Регуляция иммунной системы может нарушаться вследствие влияния множества экзо- и эндогенных факторов, к которым относятся воспалительные процессы, молекулярная мимикрия с патогенами, воздействие химических веществ, вакцинация, радиационный и генетический фон и др. [10].

В связи с этим актуальным является применение метода изучения специфического клеточного иммунного ответа – реакции ингибирования миграции лейкоцитов (РИМЛ) в присутствии антигенов соединительной ткани. Принимая во внимание данные об ассоциации воспаления с микробными агентами при воспалительно-деструктивных заболеваниях суставов, для выяснения возможного пускового механизма аутоиммунных реакций к собственной соединительной ткани логичным представляется интерес к оценке состояния клеточного ответа к бактериальным агентам.

Цель работы – изучить динамику общих и специфических иммунологических показателей при прогрессировании коксартроза на основании определения общего количества Т-лимфоцитов, Т-активных лимфоцитов, CD4+, CD8+, иммуноглобулинов классов IgM, IgA, IgG, аутоиммунных лимфо- и гранулоцитотоксических антител, а также индивидуальной клеточной сенсibilизации к компонентам соединительной ткани – кости, хрящу, синовиальной оболочке и часто встречающимся бактериальным агентам – *Streptococcus pyogenes* (*Str. pyogenes*) и *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*).

Материалы и методы исследования. Проведено иммунологическое обследование 110 лиц с коксартрозом (основная группа). Коксартроз I стадии выявлен у 20 пациентов, II стадии – у 24, III стадии – у 31, IV стадии – у 35. Средний возраст обследуемых составил $64,2 \pm 2,0$ года. В контрольную группу вошли 20 человек, сопоставимых по возрасту и полу с пациентами основной группы. Общее количество Т-лимфоцитов, субпопуляций CD4+ и CD8+ определяли с помощью моноклональных антител (MONOCLONAL ANTI-HUMAN CD3, CD4, CD8, Sigma-Aldrich, Германия) методом прямой иммунофлуоресценции с иммуноглобулинами, мечеными флуоресцеин-5-изотиоцианатом [11]. Тест розеткообразования использовали для определения уровня Т-активных лимфоцитов [12]. Концентрации IgM, IgA и IgG определяли с помощью наборов реактивов ELISA (Human IgG total ELISA, Human IgA total ELISA, Human IgM total ELISA, eBioscience, Австрия). Наличие циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) [13]. Миграционная активность лейкоцитов в присутствии тканевых и бактериальных антигенов оценивалась в РИМЛ [14]. Для исследования стимулированной миграции лейкоцитов применяли тканевые антигены кости, хряща и синовиальной оболочки, а также бактериальные антигены *St. aureus*, *Str. pyogenes*. В качестве тканевых антигенов использовали экстракты гомогенатов соответствующих тканей на 0,9 %-ном растворе NaCl с конечным содержанием белка 100 мкг/мл. Для оценки миграционной активности лейкоцитов рассчитывали индекс миграции (ИМ), соответствующий отношению площади миграции в опытной пробе к таковой в контроле. Уровень аутоиммунных лимфо- и гранулоцитотоксических антител определяли по соответствующей методике [15]. Статистическая обработка проведена с помощью пакета программ Statistica 10.0. Для сравнения величин использовали *t*-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. У больных коксартрозом в сравнении с лицами группы контроля наблюдалось увеличение уровней IgM, IgA и IgG на 36,3; 20,5 и 14,4 % соответственно (табл. 1). Кроме того, отмечалось повышение уровней аутоиммунных лимфоцитотоксических антител на 45,1 % и аутоиммунных гранулоцитотоксических антител на 28,3 %, свидетельствующее о выраженной активации гуморальных факторов в отношении собственных клеток в патогенезе коксартроза. Со стороны клеточного звена иммунитета у пациентов определялось снижение уровней CD3+, Т-активных лимфоцитов и CD8+ на 14,2; 14,9 и 34,9 % соответственно. На изменение клеточных механизмов иммунного ответа при коксартрозе указывают и другие авторы [2].

Т а б л и ц а 1.
Общие иммунологические показатели
у больных коксартрозом
Table 1. General immunological
parameters in patients with coxarthrosis

Показатель	Группа контроля (n = 20)	Больные коксартрозом (n = 110)
IgM, г/л	1,21±0,03	1,65±0,05*
IgA, г/л	2,00±0,08	2,41±0,11*
IgG, г/л	11,10±0,50	12,70±0,57*
Аутоим. лимф. антитела, %	6,20±0,43	15,20±0,51*
Аутоим. гранул. антитела, %	4,30±0,20	9,82±0,32*
CD3+, %	65,50±3,47	56,20±3,11*
Т-акт. лимф., %	34,80±2,01	29,60±1,41*
CD4+, %	38,40±3,17	40,20±3,37*
CD8+, %	24,63±2,61	15,90±1,85*

* $p < 0,05$.

Прогрессирование коксартроза сопровождалось закономерным увеличением уровней всех классов иммуноглобулинов. Так, отмечено следующее повышение их уровней: IgM – от $1,07 \pm 0,03$ г/л при I стадии до $1,76 \pm 0,06$ г/л при IV стадии, IgA – от $1,83 \pm 0,08$ г/л при I стадии до $2,57 \pm 0,20$ г/л при IV стадии, IgG – от $10,06 \pm 0,63$ г/л при I стадии до $13,60 \pm 0,82$ г/л при IV стадии. Как видно из табл. 2, наблюдаемые отличия в содержании иммуноглобулинов между всеми стадиями коксартроза свидетельствуют о возможности использовать определение их уровней для мониторинга прогрессирования коксартроза.

В клеточном звене иммунитета выраженные изменения наблюдались при IV стадии заболевания в виде снижения уровней CD3+ и CD8+ на 11,0 и 38,4 % соответственно в сравнении с таковыми у больных коксартрозом I стадии. При этом отмечено достоверное увеличение иммуно-

При исследовании клеточно-специфического ответа у большинства пациентов с коксартрозом отмечалось ускорение миграции лейкоцитов (ИМ > 1,1) на тканевые антигены. Так, повышение ИМ (> 1,1) в присутствии антигенов костной ткани выявлено у 63 (57,27 %) лиц, а снижение ИМ (< 0,9) – у 15 (13,63 %). ИМ > 1,1 на антигены хрящевой ткани определялся у 60 (54,5 %) пациентов, а ИМ < 0,9 – у 15 (13,63 %). ИМ > 1,1 на антигены синовиальной оболочки выявлен у 50 (45,45 %) лиц, а ИМ < 0,9 – у 28 (25,45 %). У остальных пациентов ИМ на тканевые антигены определен в референтных пределах (0,9–1,1).

В отношении бактериальных антигенов почти у половины пациентов (47 (41,8 %) человек) отмечено проявление гуморального типа реакции (ускорение миграции лейкоцитов) на антигены *Str. pyogenes* и у трети пациентов (34 (31 %) человека) – торможение (ИМ < 0,9). Напротив, на антигены *St. aureus* определялось сравнительно одинаковое по частоте как ускорение (39 (35,4 %) человек), так и торможение миграции лейкоцитов (43 (39,0 %) пациента).

Т а б л и ц а 2. Общие и специфические иммунологические показатели при прогрессировании коксартроза

Table 2. General and specific immunological parameters in the progression of coxarthrosis

I (n = 20)	Стадия коксартроза				
	II (n = 24)	III (n = 31)	IV (n = 35)		
IgM, г/л	1,07±0,03	1,34±0,04*	1,52±0,06***	1,76±0,06****	
IgA, г/л	1,83±0,08	2,02±0,10*	2,24±0,17***	2,57±0,20****	
IgG, г/л	10,06±0,63	10,55±0,67*	11,93±,74***	13,60±0,82****	
Аутоим. лимф. антитела, %	13,45±1,12	13,51±1,20	13,00±1,17	16,22±1,30***	
Аутоим. гранул. антитела, %	10,75±0,70	12,92±1,00	9,53±0,60	9,61±0,62	
CD3+, %	61,30±3,81	61,50±3,60	56,50±3,51	54,50±3,40*	
Т-актив. лимфоциты, %	37,30±2,30	35,16±2,23	27,50±1,70*	29,20±1,84*	
CD4+, %	38,00±2,70	41,40±3,32	36,25±2,40	40,22±3,10	
CD8+, %	23,30±1,77	20,16±1,54	20,25±1,60	14,33±1,40****	
ЦИК, усл. ед.	62,12±3,00	86,50±4,21*	92,5±6,10*	81,80±4,00*	
LIF, М±m	1,20±0,05	1,11±0,02	1,14±0,04	1,00±0,03*	
ИМ на антигены	кости	1,17±0,04	1,08±0,01	1,12±0,02**	1,20±0,04****
	хряща	1,16±0,02	1,15±0,02	1,22±0,03***	1,13±0,01***
	синов. оболочки	1,11±0,03	1,07±0,01	1,16±0,01**	1,08±0,02***

Примечание. Достоверность различий ($p < 0,05$) в сравнении с больными коксартрозом I (*), II (**) и III (***) стадиями.

регуляторного индекса (ИРИ) от $1,96 \pm 0,04$ (при I стадии коксартроза) до $3,22 \pm 0,07$ (при IV стадии коксартроза). Уровень Т-активных лимфоцитов снижался на III и IV стадиях заболевания на 26,2 и 21,7 % в сравнении с таковым у больных коксартрозом I стадии. Определялись увеличенные уровни циркулирующих иммунных комплексов на всех стадиях заболевания, при этом основной пик подъема наблюдался на II стадии коксартроза.

Уровень исходного фактора торможения миграции лейкоцитов (LIF) при I стадии коксартроза оказался ниже ($ИМ = 1,2 \pm 0,05$), чем при IV стадии ($ИМ = 1,0 \pm 0,03$), что подтверждает данные о повышении фактора торможения миграции лейкоцитов по мере увеличения активности воспалительного процесса [16].

Оценка показателей специфического иммунного ответа при прогрессировании коксартроза в РИМЛ, отражающая деструктивный тип аутоиммунных проявлений, позволила выявить некоторые особенности. Так, на III–IV стадии заболевания наблюдалось ускорение миграции лейкоцитов на антигены костной ткани – $ИМ = 1,12 \pm 0,02$ и $ИМ = 1,2 \pm 0,04$ соответственно. При III стадии коксартроза отмечалось также ускорение миграции лейкоцитов на антигены хряща – $ИМ = 1,22 \pm 0,03$, синовиальной оболочки – $ИМ = 1,16 \pm 0,01$. При IV же стадии заболевания по сравнению с III стадией наблюдалось не ускорение, а относительное торможение миграции лейкоцитов на антигены хряща и синовиальной оболочки – $ИМ = 1,13 \pm 0,01$ и $ИМ = 1,08 \pm 0,02$ соответственно.

В связи с различным типом реакции на бактериальные антигены в РИМЛ был проведен анализ распределения пациентов в зависимости от гуморального или клеточного типа сенсибилизации (ускорения или торможения миграции лейкоцитов) (рис. 1, 2). Оказалось, что на I стадии заболевания наблюдается относительно одинаковое распределение пациентов по характеру клеточно-специфического ответа на антигены *Str. pyogenes* в РИМЛ – по 37,5 % с $ИМ < 0,9$ и $ИМ > 1,1$. При II и III стадиях заболевания наблюдалось превалирование пациентов с ускоренным типом миграции лейкоцитов на антигены *Str. pyogenes* (50 и 40,5 % соответственно). На IV же стадии доля лиц с торможением миграции лейкоцитов на антигены *Str. pyogenes* возросла на 11,5 % в сравнении с таковой при III стадии.

На антигены *St. aureus* в РИМЛ на I стадии коксартроза выявлено превалирование лиц с тормозным типом реакции (50 %). На II–III стадиях, как и для *Str. pyogenes*, чаще наблюдался ускоренный тип реакции – у 43,4 и 47,3 % пациентов соответственно, а на IV стадии коксартроза количество лиц с клеточной сенсибилизацией вновь возросло – на 18,9 % в сравнении с их количеством при III стадии коксартроза.

В связи с выявленной тенденцией к изменению клеточного ответа на бактериальные антигены при прогрессировании коксартроза проведен анализ распределения пациентов по клеточному ответу и на тканевые антигены. Так, на всех стадиях коксартроза доминировало количество

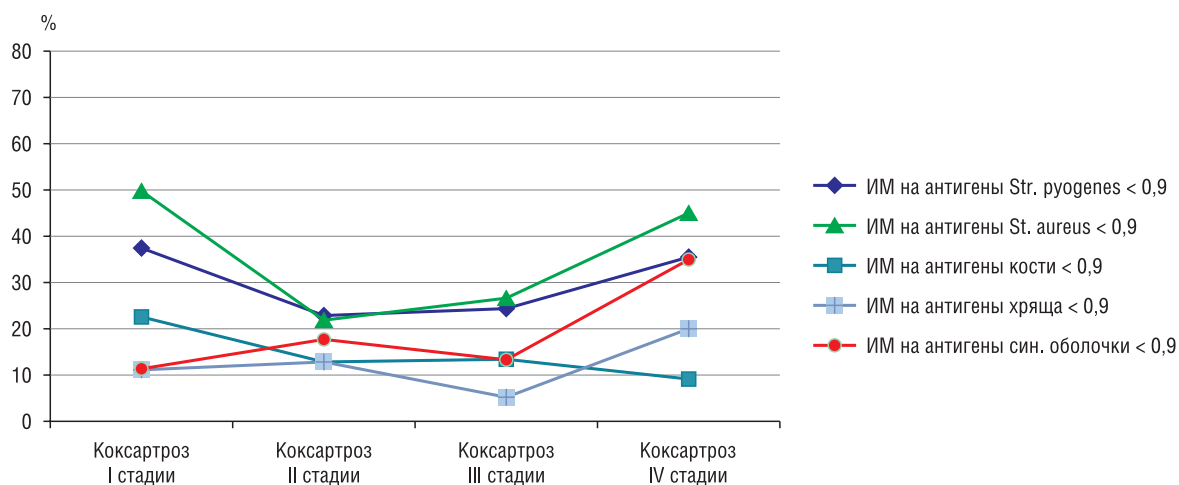


Рис. 1. Распределение пациентов с торможением миграции лейкоцитов на бактериальные и тканевые антигены при прогрессировании коксартроза

Fig. 1. Distribution of patients with leukocyte migration inhibition to bacterial and tissue antigens in the progression of coxarthrosis

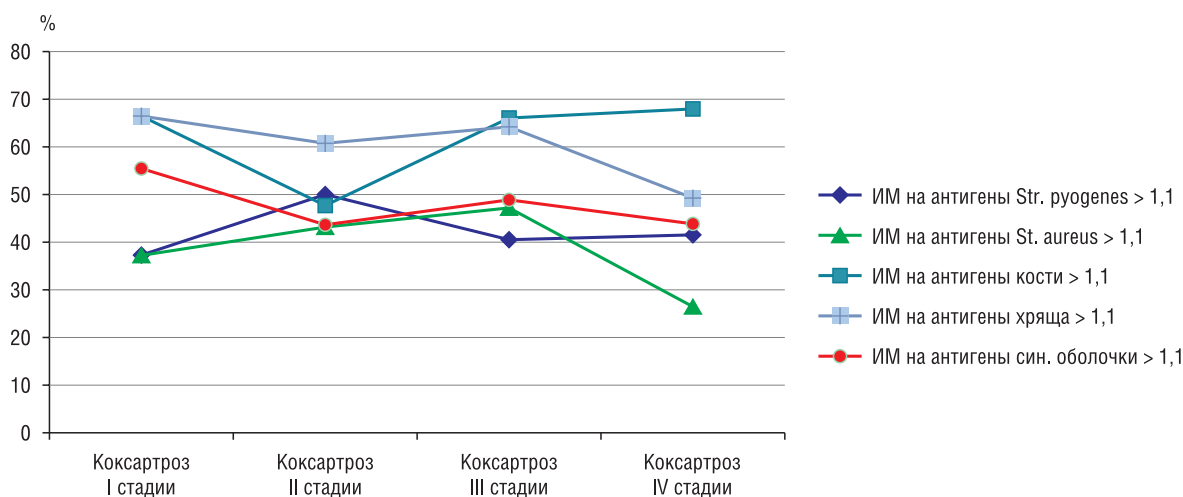


Рис. 2. Распределение пациентов с ускорением миграции лейкоцитов на бактериальные и тканевые антигены при прогрессировании коксартроза

Fig. 2. Distribution of patients with leukocyte migration enhancement to bacterial and tissue antigens in the progression of coxarthrosis

лиц с ускоренным типом миграции лейкоцитов на антигены костной ткани, достигающее наибольшего показателя при IV стадии – 68,1 %. Аналогично наблюдалось превалирование лиц с ускоренным характером миграции лейкоцитов и на антигены хрящевой ткани и синовиальной оболочки, однако на IV стадии заболевания выявлено увеличение доли пациентов с торможением миграции лейкоцитов на антигены хряща и синовиальной оболочки на 14,9 и 11,7 % соответственно.

По мнению большинства авторов, ведущая роль в индукции аутоиммунных состояний принадлежит вирусам, бактериям, простейшим и грибам [17–20].

Так, установлены ассоциации аутоиммунных поражений соединительнотканной ткани с β -гемолитическим стрептококком группы А, иерсиниями, сальмонеллами, хламидиями, микобактериями, кампилобактериями и др. Рассмотрены три механизма запуска аутоиммунных процессов инфекционными агентами: молекулярная мимикрия, поликлональная неспецифическая и опосредованная активация иммунной системы вследствие хронической инфекции [7]. Доминирующая концепция «молекулярной мимикрии», предложенная Р. Домейном и основанная на структурном сходстве патогена или его метаболитов с тканями человека, во многом объясняет ассоциацию инфекционного и аутоиммунного процессов [21]. Опосредованная активация предполагает, что цитотоксические факторы организма способны уничтожать не только инфицированные, но и близлежащие клетки. При хронической инфекции микроб может длительно находиться в клетках стромы, что позволяет ему избегать иммунного ответа, однако обнаружение и уничтожение иммунной системой таких клеток отражается на функциональном состоянии инфицированной ткани. В качестве примеров представлены аутоиммунный миокардит, медленно прогрессирующая демиелинизация при аутоиммунном энцефаломиелите. По мнению С. В. Сучкова (2008), агрессия микробов зачастую становится причиной срыва естественной толерантности и аутоиммунных нарушений, что необходимо рассматривать как осложнение инфекционного процесса [8, 22, 23].

В предыдущих наших исследованиях выявлена ассоциация типов клеточного ответа в РИМЛ на бактериальные и тканевые антигены по достоверно высоким коэффициентам корреляции. Так, у пациентов с воспалительно-дистрофическими заболеваниями позвоночника и суставов ИМ на антигены *St. aureus* и *Str. pyogenes* коррелировали с ИМ на антигены синовиальной оболочки и хрящевой ткани [24]. Поэтому полученные результаты по увеличению количества пациентов с клеточной сенсibilизацией на антигены синовиальной оболочки, хрящевой ткани, *Str. pyogenes* и *St. aureus* на IV стадии коксартроза неслучайны и могут быть объяснены структурным сходством тканевых и бактериальных антигенов.

Полученные нами результаты свидетельствуют об аутоиммунном генезе коксартроза, опосредованном микробной сенсibilизацией, и совпадают с выводами других авторов [25] о том, что изучение активности аутоиммунного ответа к собственным тканям необходимо в прогнозировании течения различных заболеваний и синдромов (не только аутоиммунных), поскольку анализ специфических показателей аутоиммунного ответа позволяет судить о начинающихся или уже манифестировавших патологических процессах любой органной локализации. При этом коррекция изменений органоспецифического аутоиммунитета позволит своевременно модулировать клиническую манифестацию соответствующих форм патологии.

Заключение. У больных коксартрозом отмечено превалирование гуморального и дефицит клеточного иммунитета в виде повышения уровней IgM, IgA, IgG, возрастающих по мере утяжеления стадии заболевания, и снижение содержания CD3+, CD8+ и Т-активных лимфоцитов. О деструктивных процессах в соединительной ткани свидетельствует увеличение уровней аутоиммунных лимфо- и гранулоцитотоксических антител. Специфический иммунный ответ характеризуется клеточной сенсibilизацией в РИМЛ (чаще по ускоренному типу) к антигенам кости, хряща и синовиальной оболочки, при этом в отношении бактериальных антигенов на *Str. pyogenes* доминирует ускорение миграции лейкоцитов, а на *St. aureus* – торможение. При IV стадии заболевания отмечается дефицит Т-супрессорного звена с активацией клеточного аутоиммунного ответа на антигены хрящевой ткани и синовиальной оболочки, опосредованной микробной сенсibilизацией к антигенам *Str. pyogenes* и *St. aureus*. Выявленная статистически достоверная ассоциация однонаправленности клеточной сенсibilизации к тканевым и бактериальным антигенам может быть объяснена явлением антигенной мимикрии, поэтому для своевременной терапевтической коррекции при коксартрозе необходим контроль специфического клеточного аутоиммунного ответа.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Дмитриева, Л. А. Иммунопатологические проявления у больных с тяжелыми формами коксартроза / Л. А. Дмитриева, Е. Ю. Коршунова, В. Ф. Лебедев // Мед. иммунология. – 2009. – Т. 11, №2/3. – С. 161–168.
2. Імунний стан хворих з різними формами перебігу ідіопатичного та диспластичного коксартрозу / Г. В. Гайко [та інш.] // Вісн. ортопедії, травматології та протезування. – 2013. – №4. – С. 4–8.
3. Дубровин, Г. М. Роль цитологического исследования синовиальной жидкости в диагностике дегенеративно-дистрофических изменений суставов / Г. М. Дубровин, А. А. Нетяга, С. В. Нетяга // Курск. науч.-практ. вестн. – 2005. – № 1. – С. 45–49.
4. Окорочков, А. Н. Деформирующий остеоартроз / А. Н. Окорочков, Н. П. Базеко. – М. : Мед. лит., 2003. – 324 с.
5. Балабанова, Р. М. Роль иммунного воспаления в патогенезе остеоартроза, возможности коррекции иммунных нарушений / Р. М. Балабанова // Совр. ревматология. – 2011. – №4. – С. 74–78.
6. Грабар, П. Н. Аутоантитела и иммунологические теории / П. Н. Грабар // Онтогенез. – 1975. – Т. 6, №2. – С. 115–126.
7. Мальцев, С. В. Естественные аутоантитела к почечным антигенам как прогностический фактор развития пиелонефрита / С. В. Мальцев, Г. Ш. Мансурова, А. Б. Полетаев // Вопр. совр. педиатрии. – 2007. – Т. 6, №3. – С. 116–117.
8. Полетаев, А. Б. Иммунофизиология и иммунопатология / А. Б. Полетаев. – М. : МИА, 2008. – 208 с.
9. Полетаев, А. Б. О «трудных вопросах» аутоиммунитета, или как концепция иммункулуса может стать основой профилактической медицины / А. Б. Полетаев // Медицина, XXI век. – 2008. – №2. – С. 84–91.
10. Harel, M. Predicting and preventing autoimmunity, myth or reality / M. Harel, Y. Shoenfeld // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006. – N 1069. – P. 322–345.
11. Хаитов, Р. М. Экологическая иммунология / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, Х. И. Истамов. – М. : Изд-во ВНИРО, 1995. – 219 с.
12. Catsimooopal N. Methods of cell separation / N. Catsimooopal. – New York: Springer US. – 1980. – 204 p.
13. Способ определения циркулирующих иммунных комплексов / Б. Б. Шайбонов [и др.] // Патогенез = Pathogenesis. – 2013. – Т. 11, №1. – С. 74–79.
14. Oxidative stress and leukocyte migration inhibition response in cutaneous adverse drug reactions / P. Verma [et al.] // Indian J. of Dermatology, Venerology and Leprology. – 2012. – Vol. 78, N 5. – P. 664.
15. Профилактика и лечение невынашивания беременности и лейкоцитарной несовместимости : метод. рекомендации / А. Д. Исаева [и др.] – Харьков : Изд-во Харьков. гос. ун-та, 1975. – 19 с.
16. Vincristine-induced fever in a child with rhabdomyosarcoma: cellular hypersensitivity to vincristine demonstrated by leukocyte migration test / C. Imai [et al.] // J. Pediatr. Hematol. Oncol. – 2001. – Vol. 23, N 1. – P. 73–74.

17. Bizzaro, N. Autoantibodies as predictor of disease: the clinical and experimental evidence / N. Bizzaro // *Autoimmune Rev.* – 2007. – Vol. 6. – P. 325–333.
18. Полетаев, А. Б. Клиническая и лабораторная иммунология : избр. лекции / А. Б. Полетаев. – М. : МИА, 2007. – 184 с.
19. Ашмарин, И. П. История и практические перспективы нового понимания роли аутоиммунитета / И. П. Ашмарин // *Естественный аутоиммунитет в норме и патологии : тез. докл. 1-й Моск. междунар. конф.* – М., 2005. – С. 44–45.
20. Маркина, О. А. Перекрестные реакции между антигенами легочной ткани и некоторыми видами микроорганизмов / О. А. Маркина, Н. Е. Ястребова, В. Н. Ляшова // *Мед. иммунология.* – 2003. – Т. 4, № 2. – С. 205.
21. Полетаев А. Б. Иммунофизиология и иммунопатология / А. Б. Полетаев. – М. : МИА, 2008. – 208 с.
22. Мальцев, С. В. Диагностическое и прогностическое значение определения аутоантител к почечным антигенам в развитии пиелонефрита у детей / С. В. Мальцев, Г. Ш. Мансурова, А. Б. Полетаев // *Педиатрия.* – 2007. – Т. 86, № 6. – С. 60–64.
23. Симонова, А. В. Новые подходы к оценке иммунного статуса при хронических инфекционных и воспалительных заболеваниях человека / А. В. Симонова // *Естественный аутоиммунитет в норме и патологии : материалы 1-й Моск. междунар. конф.* – М., 2005. – С. 91–92.
24. Оптимизация лечения больных воспалительно-деструктивными заболеваниями позвоночника и суставов с учетом специфических иммунологических показателей / Н. А. Корж [и др.] // *Ортопедия, травматология и протезирование.* – 2017. – № 3. – С. 68–72.
25. Notkins, A. L. New predictors of disease / A. L. Notkins // *Sci. American.* – 2007. – Vol. 296, N 3. – P. 72–80.

References

1. Dmitrieva L. A., Korshunova E. Iu., Lebedev V. F. Immunopathological manifestations in patients with severe forms of coxarthrosis. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical Immunology], 2009, vol. 11, no. 2–3, pp. 161–168 (in Russian).
2. Gayko G. V., Kalashnikov O. V., Panchenko L. M., Sokolovska O. R. Immunity of the patients with the rare forms of idiopathic and dysplastic coxarthrosis. *Visnyk ortopedii, travmatologii ta protezuvannja* [Bulletin of orthopedics, traumatology and prosthetics], 2013, no. 4, pp. 4–8 (in Russian).
3. Dubrovin G. M., Netiaga A. A., Netiaga S. V. The role of cytological study of synovial fluid in the diagnosis of degenerative-dystrophic changes of joints. *Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik* [Kursk Scientific-Practical Herald], 2005, no. 1, pp. 45–49 (in Russian).
4. Okorokov A. N., Bazeko N. P. Deforming osteoarthritis. Moscow, Meditsinskaya literatura Publ., 2003. 324 p. (in Russian).
5. Balabanova R. M. The role of immune inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis, the possibility of correction of immune disorders. *Sovremennaya revmatologiya* [Modern Rheumatology], 2011, no. 4, pp. 74–78 (in Russian).
6. Grabar P. N. Autoantibodies and immunological theories. *Ontogenez* [Ontogenesis], 1975, vol. 6, no. 2, pp. 115–126 (in Russian).
7. Mal'tsev S. V., Mansurova G. Sh., Poletaev A. B. Natural autoantibodies to renal antigens as a prognostic factor in the development of pyelonephritis. *Voprosy sovremennoi pediatrii* [Questions of Modern Pediatrics], 2007, vol. 6, no. 3, pp. 116–117 (in Russian).
8. Poletaev A. B. Immunophysiology and immunopathology. Moscow, MIA Publ., 2008. 208 p. (in Russian).
9. Poletaev A. B. On “difficult issues” of autoimmunity, or as the concept of immunoculus may become the basis of preventive medicine. *Meditsina, XXI vek* [Medicine, XXI century], 2008, no. 2, pp. 84–91 (in Russian).
10. Harel M., Shoenfeld Y. Predicting and preventing autoimmunity, myth or reality. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, no. 1069, pp. 322–345. DOI: 10.1196/annals.1351.031
11. Khaitov R. M., Pinegin B. V., Istamov X. I. *Ecological immunology*. Moscow, Izdatel'stvo VNIRO, 1995. 219 p. (in Russian).
12. Catsimopoul N. *Methods of cell separation*. New York Springer US, 1980. 204 p.
13. Shaibonov B. B., Baronets V. Iu., Panchenko L. F., Kubatiev A. A. A method for determining circulating immune complexes. *Patogenez = Pathogenesis*, 2013, vol. 11, no. 1, pp. 74–79 (in Russian).
14. Verma P., Bhattacharya S. N., Banerjee B. D., Khanna N. Oxidative stress and leukocyte migration inhibition in cutaneous adverse drug reactions. *Indian Journal of Dermatology, Venerology and Leprology*, 2012, vol. 78, no. 5, p. 664.
15. Isaeva A. D., Novachenko T. M., Delevskii Iu. P., Shcherbakova V. V. Prevention and treatment of miscarriage and leukocyte incompatibility: methodical recommendations. Kharkov, Izdatel'stvo Khar'kovskogo gosudarstvennogo universiteta, 1975. 19 p. (in Russian).
16. Imai C., Uno K., Kakihara T., Tanaka A., Uchiyama M. Vincristine-induced fever in a child with rhabdomyosarcoma: cellular hypersensitivity to vincristine demonstrated by leukocyte migration test. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2001, vol. 23, no. 1, pp. 73–74.
17. Bizzaro N. Autoantibodies as predictor of disease: the clinical and experimental evidence. *Autoimmunity Reviews*, 2007, vol. 6, pp. 325–333.
18. Poletaev A. B. *Clinical and laboratory immunology*. Moscow, MIA Publ., 2007. 184 p. (in Russian).
19. Ashmarin I. P. History and practical prospects of a new understanding of the role of autoimmunity. *Estestvennyi autoimunitet v norme i patologii: tezisy dokladov 1-i Moskovskoi mezhdunarodnoi konferentsii* [Natural autoimmunity in norm and pathology: abstracts of the reports of the 1st Moscow International conference]. Moscow, 2005, pp. 44–45 (in Russian).

20. Markina O. A., Iastrebova N. E., Liashova V. N. Cross-reactions between antigens of the lung tissue and certain microorganisms. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical Immunology], 2003, vol. 4, no. 2, p. 205 (in Russian).
21. Poletaev A. B. *Immunophysiology and immunopathology*. Moscow, MIA, 2008. 208 p. (in Russian).
22. Mal'tsev S. V., Mansurova G. Sh., Poletaev A. B. Diagnostic and prognostic value of the determination of autoantibodies to renal antigens in the development of pyelonephritis in children. *Pediatrics* [Pediatrics], 2007, vol. 86, no. 6, pp. 60–64 (in Russian).
23. Simonova A. V. New approaches to the evaluation of immune status in chronic infectious and inflammatory diseases of man. *Estestvennyi autoimmunitet v norme i patologii: materialy 1-i Moskovskoi mezhdunarodnoi konferentsii* [Natural autoimmunity in norm and pathology: materials of the 1st Moscow International conference]. Moscow, 2005, pp. 91–92 (in Russian).
24. Korzh N. A., Leont'eva F. S., Delevska V. Iu., Zarzhetskaya N. A. Optimization of treatment of patients with inflammatory-destructive diseases of the spine and joints, taking into account specific immunological parameters. *Ortopediya, travmatologiya i protezirovanie* [Orthopedics, Traumatology and Prosthetics], 2017, no. 3, pp. 68–72 (in Russian).
25. Notkins A. L. New predictors of disease. *Scientific American*, 2007, vol. 296, no. 3, pp. 72–80.

Информация об авторах

Корж Николай Алексеевич – д-р мед. наук, профессор, директор Института патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко АМН Украины (ул. Пушкинская, 80, г. Харьков, 61024, Украина). E-mail: korzh47@gmail.com.

Леонтьева Фрида Соломоновна – канд. биол. наук. Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко АМН Украины (ул. Пушкинская, 80, г. Харьков, 61024, Украина). E-mail: alwisia@i.ua.

Делевская Валентина Юрьевна – канд. мед. наук, ассистент. Харьковский национальный медицинский университет (пр. Науки, 4, 61000, г. Харьков, Украина). E-mail: valentinka_1987@ukr.net.

Хилько Максим Сергеевич – инженер-программист. «ХФП «Здоровье народу» (ул. Шевченко, 22, 61013, г. Харьков, Украина). E-mail: maxya@zn.kharkov.ua.

Information about the authors

Mykola A. Korzh – D. Sc. (Med.), Professor, Head of Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine (80, Pushkinskaya Str., 61024, Kharkiv, Ukraine). E-mail: korzh47@gmail.com.

Frieda S. Leontyeva – Ph. D. (Biol.). Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine (80, Pushkinskaya Str., 61024, Kharkiv, Ukraine). E-mail: alwisia@i.ua.

Valentyna Yu. Dielievska – Ph. D. (Med.), Assistant. Kharkiv National Medical University (4, Nauki Ave., 61000, Kharkiv, Ukraine). E-mail: valentinka_1987@ukr.net.

Maksim S. Khilko – Engineer programmer. “Zdorovye Narodu”, LTD (22, Shevchenko Str., 61013, Kharkiv, Ukraine). E-mail: maxya@zn.kharkov.ua.

АГЛЯДЫ
SURVEYS

УДК 612.343.015.1

Поступила в редакцию 23.05.2017

Received 23.05.2017

Л. А. Можейко

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ЦИРКУЛЯЦИИ ФЕРМЕНТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Аннотация. В обзоре проанализированы сведения литературы об энтеропанкреатической циркуляции ферментов. Рассмотрены пути транспорта панкреатических ферментов в кровь прямо из ацинарных клеток или через эпителиальные клетки кишечника и протоков поджелудочной железы и продемонстрированы экспериментальные доказательства энтеропанкреатической циркуляции ферментов. Показано, что панкреатические ферменты могут рекретироваться из крови, выделяться в просвет тонкого кишечника и реутилизироваться. Обсуждаются гомеостатическая, пищеварительная и регулирующая роль циркулирующих гидролаз.

Ключевые слова: энтеропанкреатическая циркуляция, поджелудочная железа, пищеварительные ферменты

Для цитирования: Можейко, Л. А. Особенности циркуляции ферментов поджелудочной железы / Л. А. Можейко // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2017. – №4. – С. 102–110.

L. A. Mozheiko

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

FEATURES OF CIRCULATION OF PANCREATIC ENZYMES

Abstract. The present article has reviewed the literature data on enteropancreatic circulation of enzymes. The paths of pancreatic enzymes transport into the blood directly from the acinar cells or through the epithelial cells of the lumen of the small intestine and pancreatic ducts are considered. Experimental evidence of enteropancreatic circulation is demonstrated. It is shown that pancreatic enzymes can be taken up by the acinar cells secreted into the small intestinal lumen and reutilized. The homeostatic, digestive and regulatory role of circulative hydrolases is discussed.

Keywords: enteropancreatic circulation, pancreas, digestive enzymes

For citation: Mozheiko L. A. Features of circulation of pancreatic enzymes. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 102–110 (in Russian).

Широкий спектр панкреатических ферментов – гидролаз – обеспечивает полостное и пристеночное кишечное пищеварение [1, 2]. Однако панкреатические ферменты присутствуют не только в полости тонкого кишечника или на поверхности его слизистой оболочки, но и в составе циркулирующей крови и лимфы [3, 4]. После длительных дискуссий признано, что крупные белковые молекулы энзимов способны транспортироваться в кровь в неизменном виде и их регулярное поступление является нормальным физиологическим процессом. Предполагается, что существуют три основных пути транспорта ферментов в кровь: непосредственно из панкреатоцитов посредством эндосекреции или через эпителиальный барьер путем резорбции из полости тонкой кишки или протоков поджелудочной железы. В последние годы особый интерес вызывают вопросы, связанные с энтеропанкреатической циркуляцией ферментов, которые первоначально секретируются в просвет двенадцатиперстной кишки, затем всасываются в кровь, а оттуда поступают в ткань поджелудочной железы, поглощаются ацинарными клетками и повторно секретируются в просвет кишки [5].

Цель настоящего обзора – проанализировать представленные в научных публикациях экспериментальные доказательства энтеропанкреатической циркуляции ферментов и на основании этого определить ее роль в происходящих в организме процессах.

Большой вклад в разработку вопросов ферментовыделительной деятельности желез, в том числе поджелудочной, внесли научные коллективы под руководством S. S. Rothman, Н. Ш. Амирова, Г. Ф. Коротько и др. [6–8], проводившие многолетние исследования. Известно, что классический традиционный способ поступления секрета из экзокринных панкреатоцитов осуществляется за счет экзоцитоза через апикальную мембрану клеток в протоки поджелудочной железы и затем в полость тонкого кишечника. Однако S. S. Rothman с сотр. [9] показали, что существует, возможно, и другой путь транспорта панкреатических ферментов – через базалотермальную плазматическую мембрану в межклеточное пространство, а оттуда – в лимфатические и кровеносные капилляры. Г. Ф. Коротько с сотр. [10, 11] подтвердили это в своих последующих исследованиях и, развивая концепцию И. П. Павлова об «уклонении» ферментов, установили, что поступление панкреатических ферментов в кровь возможно также через стенку протоков поджелудочной железы, которые являются активным транспортным компонентом, снабженным фенестрированными микрорезервуарами [12, 13]. Доказано, что резорбция гидролаз эпителиальными клетками протоков в большей мере определяется величиной внутрипротокового гидростатического давления секрета и проницаемостью гистогематического барьера [4].

Впервые возможность резорбции панкреатических ферментов из тонкой кишки с транспортом в кровотоки было показано в научных публикациях сотрудников лаборатории S. S. Rothman [10, 14] в середине 1970-х годов. Это открытие противоречило существовавшему постулату, согласно которому все пищевые вещества, поступившие в кишечник в виде сложных молекулярных структур и биополимеров, полностью расщепляются до простых соединений и только в такой форме могут всасываться во внутреннюю среду организма. Гипотеза авторов об энтеропанкреатической циркуляции ферментов, подобно энтерогепатической циркуляции желчных кислот, была необычной, удивительной и вызвала много споров. Транспорт макромолекулярных субстанций белков через несколько клеточных мембран казался невероятным.

Американскими учеными *in vitro*, *in vivo* и *in situ* были проведены фундаментальные исследования, во-первых, с целью оценки проницаемости мембран ацинарных и интестинальных клеток для пищеварительных ферментов и, во-вторых, для демонстрации возможности их циркуляции. Радионуклидное мечение ферментов и определение их каталитической активности позволило Н. Goetze, S. S. Rothman [15] установить факт активного всасывания из тонкой кишки кролика и крыс 50–65 % амилазы и 60 % химотрипсина, секретлируемых поджелудочной железой в ответ на максимальную стимуляцию в определяемый период времени. Причем амилаза транспортировалась в обоих направлениях, но преобладала активная реабсорбция в кровь. У человека результаты показали активное всасывание из тонкой кишки в кровь 50–70 % трипсина [16]. Для оценки потенциального транспорта через панкреатический эпителий, т. е. из интерстициальных пространств в протоковую систему, в аналогичных опытах *in vitro* целиком изучалась поджелудочная железа кроликов. В инкубационную среду с физиологическим раствором добавляли, как и в экспериментах с кишечником, радиоактивные формы амилазы и химотрипсиногена, которые через определенное время появлялись в дуоденальном содержимом. Подобно эпителию подвздошной кишки, слой ацинарного эпителия был избирательно проницаем для этих ферментных белков. Если в среду с эндогенным амилазным пулом, меченым радиоактивными аминокислотами, добавлялась немеченая амилаза, наблюдалось значительное уменьшение секреции эндогенного (меченого) белка, что рассматривалось как результат конкуренции за выход из клетки после смешивания эндогенного и экзогенного ферментов. Для подтверждения возможности рециркуляции панкреатических ферментов дополнительно были проведены еще три серии экспериментов на кроликах *in situ* [10]. В первой, контрольной, серии секрет забирали прямо из протока железы через катетер и постоянно удаляли. Вместо секретлируемых ферментов вводили равное количество альбумина. Во второй серии экспериментов после взятия небольшого количества секрета для определения содержания ферментов секретлируемую жидкость возвращали в просвет кишечника. В третьей серии экспериментов забранную

секретируемую жидкость вводили в большую вену. Как оказалось, возвращение секреторных белков в кишечник или внутривенно увеличивает их последующую секрецию в 2–3 раза по сравнению с контрольным уровнем, что рассматривалось как результат их реабсорбции и энтеропанкреатической циркуляции. Однако в ряде работ других исследователей это заключение не подтвердилось. Так, M. D. Levitt с соавт. [17], инъецируя радиоактивно-меченый трипсин и амилазу, обнаружили, что только 0,15 % этого трипсина и еще меньше (0,02 %) меченой амилазы выделялось в составе поджелудочного сока собак. Аналогичные результаты получены и при использовании меченых ферментов у крыс, на основании чего авторы полностью отрицали возможность энтеропанкреатической циркуляции ферментов или допускали, что она очень ограничена и не имеет биологического значения [8, 18]. G. Rohr с соавт., G. Scheele и G. Rohr [19, 20] подвергли основательной критике ранние работы создателей гипотезы энтеропанкреатической циркуляции ферментов, считая их интерпретацию данных недостаточной, а примененные ими методы – несовершенными для надежного определения ферментов. Изучая транспорт радиоактивных ферментных белков, введенных в кровь крыс, они показали, что примерно 97 % от их общего количества поглощается различными тканями, 1–2 % выделяется в виде интактных белков с мочой и 0,3–0,5 % поступает в желчь. Транспорт меченых белков из крови в панкреатический сок не наблюдался.

S. S. Rothman с соавт. [8] провели тщательный анализ данных выполненных работ и представили новые доказательства в подтверждение взглядов своих 25-летних исследований в этой области. Изучены транспорт и распределение амилазы в различных органах и тканях голодающих крыс и проведено сравнение этих показателей после трехчасовой максимальной холинергической стимуляции и последующего двухчасового восстановления. После ночного голодания около 99 % амилазной активности зафиксировано в трех органах: 92,1 % в поджелудочной железе, 5,9 % в кишечнике (в слизистой оболочке и содержимом) и 1,3 % в плазме (а также в интерстициальной жидкости) [21]. Установлено, что после трехчасовой холинергической стимуляции секреции уровень амилазы в кишечнике возрос незначительно, в то время как в плазме крови и интерстициальной жидкости он поднялся до 13 % от общего содержания амилазы в организме, став вторым по величине по сравнению с таковым в поджелудочной железе и вдвое большим, чем в тонком кишечнике. Через 2 ч последующего восстановления содержание амилазы в поджелудочной железе составило 90 % от его уровня у голодающих крыс, в то время как в крови наблюдалось снижение соответствующего количества амилазы. Темпы исчезновения амилазы из крови коррелировались с темпами ее появления в поджелудочной железе. Рассмотрев несколько возможных механизмов транспорта фермента в кровь, авторы пришли к заключению, что амилаза была абсорбирована в кровь из тонкого кишечника и реабсорбирована в поджелудочной железе [21]. Противоречивость данных своих работ и ряда других лабораторий авторы объяснили методическими разногласиями, подчеркнув, что, поскольку критически настроенные исследователи не пытались воспроизвести оригинальные наблюдения, они не считают результаты этих опытов достаточным доказательством несостоятельности энтеропанкреатической циркуляции ферментов.

В последнее время появился ряд экспериментальных работ и научных обзоров, поддерживающих идею рециркуляции пищеварительных ферментов. Так, Г. Ф. Коротько *in vitro* на вывернутых кусочках разных отделов тонкой кишки крыс установлена резорбция амилазы, наиболее выраженная в дистальных отделах органа. Всасывание существенно повышалось под воздействием желчных кислот и аутожелчи [6]. По наблюдениям А. А. Алиева [3], липаза, амилаза и мальтаза из тонкой кишки всасываются в оттекающую лимфу и кровь. В работах других исследователей [22] также утверждается возможность всасывания из кишечника в кровь сигнальных молекул гормонов, антигенов и ферментов.

В. Г. Вертипрахов и соавт. [23] впервые *in vivo* сопоставили активность панкреатических ферментов в соке поджелудочной железы, химусе двенадцатиперстной кишки, а также в плазме крови и помете фистулированных цыплят-бройлеров. Для получения химуса цыплятам первой группы вживляли фистулу в двенадцатиперстную кишку. Химус собирали натошак, затем через 1 и 2 ч после кормления. Цыплятам второй группы фистулу вживляли в панкреатический

проток, используя уникальную методику, которая позволяла получать панкреатический сок во время опытов, а в остальной период направляла его в кишечник. Количество сока и ферментативную активность определяли натощак, затем после кормления и далее каждые 30 мин в течение 3 ч. После окончания физиологических опытов определяли активность панкреатических ферментов в плазме и помете. Результаты показали, что у цыплят-бройлеров панкреатические ферменты из поджелудочной железы направляются в двенадцатиперстную кишку, участвуя в гидролизе питательных веществ, а затем поступают в кровь, но неравномерно. Относительно химуса двенадцатиперстной кишки наименьшая активность в крови отмечалась у липазы, средняя – у амилазы, достаточно высокая – у протеаз. Незначительная часть активных ферментов удалялась с пометом. Подтверждено, что кормление служит мощным стимулом панкреатической секреции и транспорта ферментов в лимфу и кровотоки [24]. Влияние корма и ферментных добавок на активность пищеварительных ферментов у цыплят-бройлеров в крови и панкреатическом соке отмечена и другими авторами [25]. Установлено наиболее близкое амилазно-протеазное соотношение ферментов в панкреатическом соке и плазме крови, что предлагается использовать при диагностике состояния поджелудочной железы [23].

Исследования транспорта ферментов из кишечника ценны не только с научной точки зрения, но и ввиду их многоплановости, в том числе в связи с методами энзимотерапии. Убедительные доказательства возможности резорбции макромолекулярных субстанций в кишечнике способствовали развитию нового направления медицины – системной энзимотерапии. О ней заговорили еще в 1930-е годы, когда выдающийся американский ученый немецкого происхождения Макс Вольф обратил внимание на то, что гидролитические принимаемые с пищей ферменты оказывают влияние на течение некоторых заболеваний, вероятно, всасываясь из просвета тонкого кишечника в кровь в неизменном виде. Сейчас это представляется очевидным фактом, подтвержденным результатами значительного количества исследований, хотя до сих пор продолжают споры о том, какое количество ферментов в нерасщепленной форме может преодолеть кишечный барьер. Скорость абсорбции ферментов зависит от многих факторов, включая время, форму и способ их введения, а также особенности использования энзимов. Согласно результатам экспериментальных исследований, проведенных с использованием гидролаз, меченных изотопом ^{14}C , а также изотопа ^3H , от 15 до 45 % действующих веществ препаратов, содержащих протеолитические ферменты, всасываются в кишечнике, оказывая лечебный эффект. Для отдельных ферментов, например амилазы и бромелаина, всасывание может достигать 39–44 %, а для других (химотрипсина и папаина) – не превышает 4–16 % [26]. Подобные результаты получены и в клинических наблюдениях с использованием двойного слепого контроля.

Существует естественный трансэпителиальный везикулярный механизм всасывания, с помощью которого в кровь из просвета кишки транспортируется основной поток всасываемых веществ. В составе этого потока наряду с мономерами могут быть макромолекулы пищеварительных ферментов [26]. Для протеиназ (как, вероятно, и для других гидролаз) рассматривается несколько механизмов переноса через кишечный барьер: рецепторный опосредованный эндоцитоз (пиноцитоз), пиноцитоз в отсутствие специфических рецепторов к всасываемым белкам, эндоцитоз через М-клетки кишечника, парацеллюлярная диффузия [27]. Лигандами в пиноцитозе могут быть ферменты, действующие на протеиназно-активируемые рецепторы апикальных и базолатеральных мембран эпителиоцитов подвздошной кишки [28, 29]. Другой путь проникновения макромолекул связан с нарушением целостности эпителиального барьера кишечника при деструктивных и воспалительных процессах.

Транспортированные в кровь ферменты находятся в солюбилизированном состоянии или адсорбированы ее белками или форменными элементами. Значительное количество ферментов из кровотока адсорбируется эндотелием кровеносных капилляров. Установлена избирательная аффинность разных ферментов с фракциями белков плазмы крови. В плазме крови здорового человека панкреатическая α -амилаза связана преимущественно с альбуминами и считается формой депонирования фермента в крови [7]. Сложным трансформациям в крови подвержены панкреатические сериновые протеиназы – трипсин и химотрипсин. После всасывания происходит их связывание с белками крови, так называемыми сывороточными ингибиторами протеиназ

(антипротеазами). В плазме крови их около 10 % от общего содержания белков. Большинство антипротеаз относится к группе острофазовых белков. Они влияют на активность ферментов и модулируют их специфичность. Основными ингибиторами протеиназ являются α_1 – ингибитор протеиназ и α_2 – макроглобулин. Первый полностью инактивирует панкреатические протеиназы, а второй лишь ограничивает их способность расщеплять большинство высокомолекулярных белков [27]. Наиболее изученным является α_2 -макроглобулин. Связь между α_2 -макроглобулином и протеолитическими ферментами обратима. При этом ферменты, располагаясь внутри его, не только сохраняют свою каталитическую активность, но и пространственно регулируются по отношению к своему субстрату [22, 30]. Комплексы протеиназ с ингибиторами обладают свойствами лигандов ряда мембранных рецепторов, т. е. сохраняют свойства сигнальных молекул [27]. Для здорового человека характерно относительное постоянство ферментативной активности крови (ферментный гомеостазис), обусловленное количественной сопряженностью транспорта гидролаз в кровотоки с их экскрецией из организма ренальными и экстраренальными путями и деградацией ферментов белков сериновыми протеиназами [24].

Поступление пищеварительных ферментов в кровь взаимосвязано с механизмом регуляции секреции поджелудочной железы. В свою очередь концентрация и активность ферментов в циркулирующей крови в значительной мере определяет их рекрецию glanduloцитами. Транспорт ферментов из крови в glanduloцит происходит через его базолатеральную мембрану с помощью лигандзависимого пиноцитоза [27]. Транспорт заключенных в гранулы энзимов в клетках обеспечивается фибрилярными структурами цитоплазмы, а выделение – экзоцитозом, но не исключена возможность и диффузного транспорта и выделения ферментов через апикальную мембрану [31]. Согласно результатам хронических и острых экспериментов, гиперферментемия, вызванная разными способами, повышает содержание гидролаз в кишечном соке, а гипоферментемия, как правило, снижает дебиты и активность гидролаз в его составе [13, 32].

Таким образом, процесс рекреции и энтеропанкреатической циркуляции ферментов является одним из механизмов ферментного гомеостазиса, который поддерживается также ренальными и экстраренальными механизмами выделения гидролаз из организма, а также деградацией сериновыми протеиназами крови и тканей. Рекретированные из крови в полость пищеварительного тракта гидролазы могут участвовать (и участвуют) в пищеварительном процессе, особенно в начальный постпрандиальный период при максимальном дебите ферментов. Согласно расчетам S. S. Rothman с соавт. [8], поджелудочная железа при известных условиях не может синтезировать больше 25–50 % от общего количества панкреатических ферментов, а без многократного пополнения ферментами, всосавшимися из кишечника и циркулирующими с кровотоком, она не в состоянии обеспечить потребность в них во время кишечного пищеварения. Энтеропанкреатическая циркуляция ферментов рассматривается авторами как энергосберегающий механизм. Использование так называемого рекреторного пула ферментов особенно важно в начальный постпрандиальный период кишечного пищеварения, и не только для количественного пополнения, но и для качественной срочной адаптации к нутриентному составу принятой пищи [7, 24]. Хотя доля участия рекретированных панкреатических ферментов в процессах кишечного пищеварения точно не определена, известно, что рекреторный компонент секрета определяется главным образом транспортом ферментов в кровотоки и их содержанием в нем, изменяясь в норме и при патологии.

В последние годы интерес к изучению вопросов, связанных с циркуляцией панкреатических ферментов возрос, поскольку установлено, что они не только участвуют в пищеварении, но и обеспечивают регуляторные функции в организме [33–35]. Сигнальная роль гидролитических ферментов, оказывающих модулирующее влияние на их внутриклеточное выделение, показана впервые S. S. Rothman на изолированных *in vitro* поджелудочных железах кроликов. Позже на кроликах и крысах *in situ* было продемонстрировано, что введение амилазы в тонкую кишку и внутривенно увеличивает ее рекрецию и тормозит синтез, но стимулирует синтез химотрипсиногена, а при введении химотрипсиногена увеличивается его рекреция и тормозится синтез, отмечается нарастание синтеза амилазы [8, 36]. Предполагается, что эндосекретированные и резорбированные панкреатические гидролазы также обладают свойством торможения экзо-

секреции одноименного фермента и одновременного индуцирования синтеза и экзосекреции разноименного фермента. С открытием вездесущих протеиназоактивируемых рецепторов [ПАР] сигнальная и модулирующая роль протеиназ, в том числе и эндосекретируемых, планомерно исследуется [28, 29]. Не исключено, что липаза и амилаза также обладают такими свойствами [37, 38]. Дальнейшее изучение циркуляции панкреатических ферментов может иметь важное значение для понимания дефицита ферментов в процессе пищеварения и использования их как биохимических маркеров при оценке состояния поджелудочной железы.

Таким образом, проведенный анализ литературных сведений позволяет заключить, что энтеропанкреатическая циркуляция ферментов поджелудочной железы не только возможна, но физиологически целесообразна и необходима для нормального пищеварительного процесса. Панкреатические ферменты, поступившие в кровь непосредственно из ацинарных клеток или через эпителиальный барьер из полости тонкой кишки или протоков поджелудочной железы, входят в состав депонированного пула и способствуют поддержанию ферментного гомеостаза. Из образованного резерва циркулирующие в крови ферменты могут абсорбироваться glanduloцитами и выделяться в полость кишечника. Это позволяет не только пополнить количество ферментов кишечного сока, адаптировать его к нутриентному составу пищи, особенно в начальный постпрандиальный период, но и сэкономить энергетические ресурсы клеток. Регуляторная и сигнальная роль гидролаз менее изучена, чем пищеварительная, хотя перспективность этого направления очевидна не только в научном, но и в прикладном плане.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Можейко, Л. А. О гетерогенности экзокринного отдела поджелудочной железы и его физиологических резервах // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2009. – №4. – С. 66–69.
2. О возможности кишечной резорбции панкреатических гидролаз // Мембранное пищеварение и всасывание / Г. Ф. Коротько [и др.]. – Рига, 1986. – С. 61–63.
3. Алиев, А. А. Лимфа и лимфообращение у продуктивных животных / А. А. Алиев. – Л. : Наука, 1982. – 288 с.
4. Коротько, Г. Ф. Регуляторные контуры коррекции секреции поджелудочной железы / Г. Ф. Коротько, С. Э. Восканян // Успехи физиол. наук. – 2005. – Т. 36, №3. – С. 45–55.
5. Коротько, Г. Ф. Секреция поджелудочной железы: от Павловских начал к настоящему : (к 110-летию присуждения И. П. Павлову Нобелевской премии) / Г. Ф. Коротько // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2014. – Т. 24, №3. – С. 4–12.
6. Коротько, Г. Ф. Роль белков плазмы крови в обеспечении гомеостаза ферментов пищеварительных желез в периферической крови / Г. Ф. Коротько, Е. Ю. Юабова // Физиология висцеральных систем. – СПб., 1992. – Т. 3. – С. 145–149.
7. Коротько, Г. Ф. Секреция поджелудочной железы / Г. Ф. Коротько. – 2-е изд., доп. – Краснодар : Изд-во КГМУ, 2005. – 312 с.
8. Rothman, S. S. Conservation of digestive enzymes / S. S. Rothman, C. Liebow, L. Isenman // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82, N 1. – P. 1–18.
9. Isenman, L. D. The transport of protein through the basolateral membrane of the pancreatic acinar cell / L. D. Isenman, S. S. L. D. Rothman // *Physiologist.* – 1975. – Vol. 18. – P. 259–264.
10. Götze, H. Enteropancreatic circulation of digestive enzyme as a conservation mechanism / H. Götze, S. S. Rothman // *Nature.* – 1975. – Vol. 257. – P. 607–609.
11. Miyasaka, K. The endocrine secretion of alpha-amylase by the pancreas / K. Miyasaka, S. S. Rothman // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 1981. – Vol. 241, N 2. – P. 170–175.
12. Восканян, С. Э. Морфофункциональная организация поджелудочной железы и клинико-экспериментальные аспекты острого послеоперационного панкреатита : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.17 / Гос. науч. центр Рос. Федерации – Федерал. мед. биофиз. центр им. А. И. Бурназяна Федерал. медико-биол. агенства. – М., 2013. – 48 с.
13. Коротько, Г. Ф. Рекреция ферментов и гормонов экзокринными железами / Г. Ф. Коротько // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т. 34, №2. – С. 21–32.
14. Liebow, C. Enteropancreatic circulation of digestiveenzymes // C. Liebow, S. S. Rothman / *Science.* – 1975. – Vol. 189. – P. 472–474.
15. Goetze, H. Amylase transport across ileal epithelium *in vitro* / H. Goetze, S. S. Rothman // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1978. – Vol. 512, N 1. – P. 214–220.
16. Enteropancreatic circulation of trypsin in man / H. C. Heinrich [et al.] // *Klin. Wschr.* – 1979. – Vol. 57, N 23. – P. 1295–1297.
17. Study of the possible enteropancreatic circulation of pancreatic amylase in the dog / M. D. Levitt [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 1981. – Vol. 241, N 1. – G54–58.

18. Rohr, G. Fate of radioactive exocrine pancreatic proteins injected into the blood circulation of the rat. Tissue uptake and transepithelial excretion / G. Rohr, G. Scheele // *Gastroenterology*. – 1983. – Vol. 85, N 5. – P. 991–1002.
19. Rohr, G. Enteropancreatic circulation of digestive enzymes does not exist in the rat / G. Rohr, H. Kern, G. Scheele // *Nature*. – 1981. – Vol. 292. – P. 470–472.
20. Scheele, G. Enteropancreatic circulation of digestive enzymes / G. Scheele, G. Rohr // *Gastroenterology*. – 1984. – Vol. 86, N 4. – P. 778–780.
21. Miyakasa, K. Redistribution of amylase activity accompanying its secretion by the pancreas / K. Miyakasa, S. S. Rothman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1982. – Vol. 79, N 17. – P. 5438–5442.
22. Мазо, В. К. Всасывание белковых антигенов и пищевая аллергия / В. К. Мазо // *Пищевая аллергия и непереносимость пищевых продуктов* / А. М. Ногаллер, И. С. Гушин, В. К. Мазо, И. В. Гмошинский. – М., 2008. – С. 93–117.
23. Вертипрахов, В. Г. Активность ферментов поджелудочной железы у цыплят-бройлеров на разных этапах пищеварения / В. Г. Вертипрахов, А. А. Грозина, А. М. Долгорукова // *Сельскохозяйственная биология*. – 2016. – Т. 51, № 4. – С. 509–515.
24. Коротько, Г. Ф. Рециркуляция ферментов пищеварительных желез / Г. Ф. Коротько. – Краснодар : ЭДВИ, 2011. – 144 с.
25. Efficacy of supplementation of alpha-amylase-producing bacterial culture on the performance, nutrient use, and gut morphology of broiler chickens fed corn-based diet / M. Onderci [et al.] // *Poultry Sci*. – 2006. – Vol. 85, N 3. – P. 505–510.
26. Дружинин, П. В. Основы нутрициологии. Ч. 5. Ферменты и здоровье / П. В. Дружинин, Л. Ф. Новиков, Ю. А. Лысиков. – М. : Natures Sunshine Products, 2010. – 49 с.
27. Веремеенко, К. Н. О механизмах лечебного действия полиэнзимных препаратов / К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, А. И. Терзов // *Мистецтво лікування*. – 2005. – № 4. – С. 20–25.
28. *In vivo* evidence that protease-activated receptors 1 and 2 modulate gastrointestinal transit in the mouse / A. Kawabata [et al.] // *Br. J. Pharmacol*. – 2001. – Vol. 133, N 8. – P. 1213–1218.
29. Vergnolle, N. Clinical relevance of proteinase activated receptors (PARs) in the gut / N. Vergnolle // *Gut*. – 2005. – Vol. 54, N 6. – P. 867–874.
30. Протеолитические энзимы в хирургии: исторические аспекты и современные представления о применении / Н. А. Ефименко [и др.] // *Рус. мед. журн.* – 2011. – Т. 19, № 5. – С. 368–372.
31. Isenman, L. D. Protein transport across membranes: a paradigm in transition / L. D. Isenman, C. Liebow, S. S. Rothman // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1995. – Vol. 1241. – P. 341–370.
32. Шлыгин, Г. К. Роль пищеварительной системы в обмене веществ / Г. К. Шлыгин. – М. : Синергия, 2001. – 232 с.
33. Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России / Р. Грузжаускас [и др.] // *Инновационное обеспечение яичного и мясного птицеводства России : материалы VIII Междунар. конф. / Всемир. науч. ассоциация по птицеводству (ВНАП), Рос. отд-ние, Науч. центр по птицеводству. – Сергиев Посад, 2015. – С. 453–455.*
34. Kawabata, M. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease / M. Kawabata, M. Matsunami, F. Jekiguchi // *Br. J. Pharmacol*. – 2008. – Vol. 153, suppl. 1. – P. 230–240.
35. Ramachandran, R. Proteinases and signaling pathophysiological and the therapeutic implications via PARs and more / R. Ramachandran, M. D. Hollenberg // *Br. J. Pharmacol*. – 2008. – Vol. 153, suppl. 1. – P. 263–282.
36. Isenman, L. The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands / L. Isenman, C. Liebow, S. Rothman // *Am. J. Physiol*. – 1999. – Vol. 276, N 2. – P. 223–232.
37. Коротько, Г. Ф. Ферментовыделительная деятельность пищеварительных желез в нетрадиционном ракурсе / Г. Ф. Коротько // *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2013. – Т. 23, № 4. – С. 6–14.
38. Коротько, Г. Ф. Формирование ферментного компонента секретов пищеварительных желез / Г. Ф. Коротько // *Физическая культура, спорт – наука и практика*. – 2013. – № 1. – С. 51–57.

References

1. Mozheiko L. A. On the heterogeneity of the exocrine pancreas and their physiological reserves. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University], 2009, no. 4, pp. 66–69 (in Russian).
2. Korot'ko G. F., Kurzanov A. N., Lemeshkina G. S., Aleinik V. A., Baibekova G. D., Sattarov A. A. About the possibility of intestinal resorption of pancreatic hydrolases. *Membrannoe pishchevarenie i vsasyvanie* [Membrane digestion and absorption]. Riga, 1986, pp. 61–63 (in Russian).
3. Aliev A. A. *Lymph and lymphokinesis from productive animals*. Leningrad, Nauka Publ., 1982. 288 p. (in Russian).
4. Korot'ko G. F., Voskanian S. E. Regulatory circuits of the correction secretion pancreas. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* [Successes of physiological sciences], 2005, vol. 36, no. 3, pp. 45–55 (in Russian).
5. Korot'ko G. F. Secretion of the pancreas: from the Pavlovsky beginnings to the present: (to the 110th anniversary of the award of I. P. Pavlov to the Nobel Prize). *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii* [Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology], 2014, vol. 24, no. 3, pp. 4–12 (in Russian).
6. Korot'ko G. F., Yuabova E. Yu. The role of plasma proteins in maintaining homeostasis of the digestive gland enzymes in peripheral blood. *Fiziologiya vistseral'nykh sistem* [Physiology of visceral systems]. Saint Petersburg, 1992, vol. 3, pp. 145–149 (in Russian).

7. Korot'ko G. F. *Secretion of the pancreas*. Krasnodar, Izdatel'stvo Krasnodarskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta, 2005. 312 p. (in Russian).
8. Rothman S. S., Liebow C., Isenman L. Conservation of digestive enzymes. *Physiological Reviews*, 2002, vol. 82, no. 1, pp. 1–18. DOI: 10.1152/physrev.00022.2001
9. Isenman L. D., Rothman S. S. L. D. The transport of protein through the basolateral membrane of the pancreatic acinar cell. *Physiologist*, 1975, vol. 18, pp. 259–264.
10. Götze H., Rothman S. S. Enteropancreatic circulation of digestive enzyme as a conservation mechanism. *Nature*, 1975, vol. 257, pp. 607–609.
11. Miyasaka K., Rothman S. S. The endocrine secretion of alpha-amylase by the pancreas. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1981, vol. 241, no. 2, pp. 170–175.
12. Voskanyan S. E. *Morphofunctional organization of the pancreas and clinical and experimental aspects of acute post-operative pancreatitis*, Abstract of D. Sc. diss., Surgery, State Scientific Center of the Russian Federation – A. I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the Federal Medical and Biological Agency. Moscow, 2013. 48 p. (in Russian).
13. Korot'ko G. F. Recretion of enzymes and hormones exocrine glands. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* [Successes of physiological sciences], 2003, vol. 34, no. 2, pp. 21–32 (in Russian).
14. Liebow C., Rothman S. S. Enteropancreatic circulation of digestive enzymes. *Science*, 1975, vol. 189, pp. 472–474.
15. Goetze H., Rothman S. S. Amylase transport across ileal epithelium *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1978, vol. 512, no. 1, pp. 214–220.
16. Heinrich H. C., Gabbe E. E., Bruggeman L., Icagic F., Glassen M. Enteropancreatic circulation of trypsin in man. *Klinische Wochenschrift*, 1979, vol. 57, no. 23, pp. 1295–1297.
17. Levitt M. D., Ellis C. J., Murphy S. M., Schwartz M. I. Study of the possible enteropancreatic circulation of pancreatic amylase in the dog. *The American Journal of Physiology*, 1981, vol. 241, no. 1, G54–58.
18. Rohr G., Scheele G. Fate of radioactive exocrine pancreatic proteins injected into the blood circulation of the rat. Tissue uptake and transepithelial excretion. *Gastroenterology*, 1983, vol. 85, no. 5, pp. 991–1002.
19. Rohr G., Kern H., Scheele G. Enteropancreatic circulation of digestive enzymes does not exist in the rat. *Nature*, 1981, vol. 292, pp. 470–472. DOI: 10.1038/292470a0
20. Scheele G., Rohr G. Enteropancreatic circulation of digestive enzymes. *Gastroenterology*, 1984, vol. 86, no. 4, pp. 778–780. DOI: 10.1016/S0016-5085(84)80141-9
21. Miyakasa K., Rothman S. S. Redistribution of amylase activity accompanying its secretion by the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, vol. 79, no. 17, pp. 5438–5442.
22. Mazo V. K. The absorption of protein antigens and food allergy. *Pishchevaia allergiia i neperenosimost' pishchevykh produktov* [Food allergy and intolerance of food products]. Moscow, 2008, pp. 93–117 (in Russian).
23. Vertiprakhov V. G., Grozina A. A., Dolgorukova A. M. The activity of pancreatic enzymes on different stages of metabolism in broiler chickens. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiiia* [Agricultural Biology], 2016, vol. 51, no. 4, pp. 509–515 (in Russian).
24. Korot'ko G. F. *Recirculation of enzymes of digestive glands*. Krasnodar, EDVI Publ., 2011. 144 p. (in Russian).
25. Onderci M., Sahin N., Sahin K., Cikim G., Aydin A., Ozercan I., Aydin S. Efficacy of supplementation of alpha-amylase-producing bacterial culture on the performance, nutrient use, and gut morphology of broiler chickens fed corn-based diet. *Poultry Science*, 2006, vol. 85, no. 3, pp. 505–510.
26. Druzhinin P. V., Novikov L. F., Lysikov Yu. A. *Fundamentals of nutrition, ch. 5: Fermenty i zdorov'e*. Moscow, Natures Sunshine Products, 2010. 49 p. (in Russian).
27. Veremeenko K. N., Kizim A. I., Terzov A. I. On the mechanisms of the therapeutic effect of polyenzyme drugs. *Mistetstvo likyvaniia* [The art of licking], 2005, no. 4, pp. 20–25 (in Russian).
28. Kawabata A., Kuroda R., Nagata N., Kawao N., Masuko T., Nishikawa H., Kawai K. *In vivo* evidence that protease-activated receptors 1 and 2 modulate gastrointestinal transit in the mouse. *British Journal of Pharmacology*, 2001, vol. 133, no. 8, pp. 1213–1218. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704211
29. Vergnolle N. Clinical relevance of proteinase activated receptors (PARs) in the gut. *Gut*, 2005, vol. 54, no. 6, pp. 867–874. DOI: 10.1136/gut.2004.048876
30. Efimenko N. A., Lysenko M. V., Sternin Iu. I., Novozhilov A. A., Knorring G. Iu. Proteolytic enzymes in surgery: historical aspects and modern views on the application. *Russkii meditsinskii zhurnal* [Russian Medical Journal], 2011, vol. 19, no. 5, pp. 368–372 (in Russian).
31. Isenman L. D., Liebow C., Rothman S. S. Protein transport across membranes: a paradigm in transition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, vol. 1241, pp. 341–370.
32. Shlygin G. K. *The role of digestive system in metabolism*. Moscow, Sinergija Publ., 2001. 232 p. (in Russian).
33. Gruzhauskas R., Shashite V., Klishevichyute V., Al Sayfi D., Shtefan B., Kurlyatis A. Innovative provision of egg and meat poultry farming of Russia. *Innovacionnoe obespechenie jaichnogo i mjasnogo pticevodstva Rossii: materialy VIII Mezhdunarodnoj konferencii* [Innovative provision of egg and meat poultry in Russia: materials of the VIII International conference], World Poultry Research Association (VNAP), Russian Branch, Poultry Research Center. Sergiev Posad, 2015, pp. 453–455 (in Russian).
34. Kawabata M., Matsunami M., Jekiguchi F. Gastrointestinal roles for proteinase – activated receptors in health and disease. *British Journal of Pharmacology*, 2008, vol. 153, suppl. 1, pp. 230–240.
35. Ramachandran R., Hollenberg M. D. Proteinases and signaling pathophysiological and the therapeutic implications via PARs and more. *British Journal of Pharmacology*, 2008, vol. 153, suppl. 1, pp. 263–282. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707507

36. Isenman L., Liebow C., Rothman S. The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands. *American Journal of Physiology*, 1999, vol. 276, no. 2, pp. 223–232.

37. Korot'ko G. F. F. Enzyme-secretory activity of digestive glands: non-conventional approach. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii* [Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Coloproctology], 2013, vol. 23, no. 4, pp. 6–14 (in Russian).

38. Korot'ko G. F. Formation of the enzyme component of digestive glands. *Fizicheskaja kul'tura, sport – nauka i praktika* [Physical culture, sports – science and practice], 2013, no. 1, pp. 51–57 (in Russian).

Информация об авторе

Можейко Лариса Андреевна – канд. мед. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: mozhhejko-hist@yandex.ru.

Information about the author

Larisa A. Mozheiko – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: mozhhejko-hist@yandex.ru.

Л. И. Вязова, А. Н. Башлакова

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

АНТЕНАТАЛЬНЫЕ МИОКАРДИТЫ У ДЕТЕЙ

Аннотация. Антенатальные миокардиты развиваются в период внутриутробного развития плода. Ведущую роль в их генезе играют соматические заболевания беременной женщины, нарушение проницаемости плаценты, снижение иммунитета матери и плода, внутриутробная гипоксия плода. Обязательным морфологическим субстратом при ранних врожденных миокардитах является фиброэластоз или эластофиброз. Это связано с особенностью реакции плода на действие воспалительного агента до 7-го месяца гестации. В указанный период ткани плода еще не могут ответить классической воспалительной реакцией. В результате у большинства плодов происходит диффузное утолщение эндокарда, образуемого коллагеновой или эластической тканью. В связи с этим наличие фиброэластоэластоза или эластофиброза является маркером раннего антенатального миокардита. При позднем врожденном миокардите развивается обычная воспалительная реакция.

В статье отражены современные представления о врожденных миокардитах у детей. Изложены вопросы этиологии, патогенеза и клинических проявлений ранних и поздних антенатальных миокардитов у детей. Представлены основные подходы к выявлению, дифференциальной диагностике заболевания в зависимости от периода инфицирования плода.

Ключевые слова: плод, антенатальный миокардит, фиброэластоз, эластофиброз, кардиомегалия, сердечная недостаточность

Для цитирования: Вязова, Л. И. Антенатальные миокардиты у детей / Л. И. Вязова, А. Н. Башлакова // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 111–119.

L. I. Viazova, A. N. Bashlakova

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

ANTHENATAL MYOCARDITISES OF CHILDREN

Abstract. Anthenatal myocarditises develop in the period of pre-natal development of fetus. The leading role in their genesis is played by somatic diseases of expectant mother, placenta permeability disorder, mother and fetus immunity reduction, fetus pre-natal hypoxia. Fibro-elastosis or elasto-fibrosis is a compulsory morphological substrate. This is associated with the specific feature of the fetus response to the action of an inflammatory agent to the 7th month of gestation. During the mentioned period, fetus tissues cannot exhibit a classical inflammation reaction. As a result, a diffuse thickening of endocardium formed by collagen or elastic tissue is seen in the majority of fetuses. Owing to this fact, the presence of fibro-elastosis or elasto-fibrosis is a marker of early anthenatal myocarditis. At late congenital myocarditis, a normal inflammatory reaction occurs.

The article presents the modern concepts of congenital myocarditises of children, as well as the considerations of etiology and clinical implications of early and late anthenatal myocarditises of children. The basic approaches to the detection, differential diagnosis and treatment of disease depending on the period of fetus infection are described.

Keywords: fetus, anthenatal myocarditis, fibro-elastosis, elasto-fibrosis, cardiomegaly, heart failure

For citation: Viazova L. I., Bashlakova A. N. Anthenatal myocarditises of children. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 111–119 (in Russian).

Общая характеристика кардитов. Для обозначения воспалительного поражения миокарда, обусловленного в том числе внутриутробным проникновением инфекционных агентов, раньше использовали термин «миокардит» [1, 2]. Однако, согласно данным многочисленных исследований, у детей с вирусными и бактериальными миокардитами в патологический процесс практически всегда вовлекаются одновременно эндокард и перикард, поэтому использование термина «миокардит» не полностью отражает суть патологического процесса [3]. Исходя из этого, было предложено использовать у детей термин «кардит» [4], который обозначает одновременное

воспалительное поражение всех трех оболочек сердца – миокарда, эндокарда и перикарда. В педиатрической практике возможность их одновременного поражения обосновывают общностью функций, кровоснабжения, иммунопатологических реакций. Термин «кардит», вероятно, вполне оправдан для обозначения воспалительного процесса в сердце при внутриутробном заражении плода, когда поражаются две или три оболочки, а при приобретенном процессе рекомендуется использовать термин «миокардит», тем более что в настоящее время УЗИ сердца дает возможность четко определить локализацию воспалительного процесса [5, 6].

Раньше для обозначения кардитов, имеющих нестрептококковую этиологию, использовали термин «инфекционно-аллергический» [1, 4]. Однако, учитывая современные представления о патогенезе миокардита, этот термин нельзя считать корректным, так как это полиэтиологическое заболевание [7, 8].

Классификация. Долгие годы в отечественной клинической практике педиатры пользуются классификацией миокардитов, предложенной Н. А. Белоконов. Антенатальные (врожденные) кардиты также входят в эту группу болезней. Рабочей группой Всероссийской общественной организации «Ассоциация детских кардиологов России» в 2010 г. указанная классификация была модифицирована. В настоящее время миокардит нестрептококковой этиологии у детей обозначают как «неревматический миокардит» [3, 7].

Этиология и патогенез. Врожденные миокардиты развиваются у плода и обусловлены, как правило, соматическими заболеваниями беременной женщины, нарушением проницаемости плаценты, снижением иммунитета матери и плода, внутриутробной гипоксией плода. Антенатальные миокардиты – последствия в первую очередь вирусной инфекции, перенесенной матерью во время беременности (Коксаки А и В, ЕСНО, грипп, краснуха, ветряная оспа, герпес) [6, 9–11]. В генезе неревматических миокардитов определенное значение имеют бактериальная флора, протозойные инфекции, грибы и др. Поражение сердца может вызываться аллергической реакцией на введение лекарственных препаратов, вакцин, сывороток, действием токсинов, физических и радиационных факторов. Причиной развития миокардита может быть токсоплазменная или хламидийная инфекция [9, 12]. Заражение обычно происходит от матери при снижении плацентарного барьера. Согласно литературным данным, у 10 % детей не удается выявить этиологию кардита.

Неревматические миокардиты могут развиваться вследствие непосредственного кардиотоксического действия возбудителя и формирования воспалительных и деструктивных изменений в оболочках сердца (преимущественно миокарда) [6]. Значимая роль принадлежит иммунным нарушениям, нередко генетически детерминированным. Внедрение инфекционного агента вызывает образование цитотоксических Т-лимфоцитов, циркулирующих иммунных комплексов, вызывающих развитие аллергических реакций немедленного или замедленного типа [13, 14]. В результате повреждаются различные структуры сердца (кардиомиоциты, соединительная ткань, стенки сосудов), возникают метаболические сдвиги, активируются лизосомальные ферменты и другие медиаторы, что влечет за собой деструкцию миофибрилл, нарушение сосудистой проницаемости и микроциркуляции, возникновение тканевой гипоксии и тромбоэмболии. Совместное действие инфекционного агента и иммунопатологических процессов, как правило, способствует развитию острого миокардита. В развитии хронического процесса определяющую роль отводят аутоиммунным реакциям [7, 14].

По влиянию агрессивных факторов на плод в различные сроки гестации антенатальные кардиты разделяют на ранние и поздние [3, 9]. Обязательным морфологическим признаком ранних кардитов является фиброэластоз или эластофиброз эндокарда и миокарда [1, 4, 15]. Для поздних кардитов этот признак не характерен.

В патогенезе кардита важное значение имеет нарушение микроциркуляции с увеличением сосудистой проницаемости, приводящее к отеку миокарда и способствующее накоплению в нем иммунных комплексов. Повышение сосудистой проницаемости обусловлено высвобождением в процессе иммунной реакции вазоактивных веществ (лизосомальных ферментов, гистамина, серотонина, ацетилхолина и др.) [13, 16].

При антенатальном кардите в подавляющем большинстве случаев у плодов, новорожденных и грудных детей наблюдается диффузное утолщение эндокарда одной или более сердечных камер, образуемое коллагеновой или эластической тканью. По мнению P. R. Lurie, при этом происходит неспецифическая реакция эндокарда на любой миокардиальный стресс. В качестве миокардиального стресса могут выступать вирусные или бактериальные агенты, врожденные пороки сердца и сосудов, их сочетание, генетические аберрации, гипоксия, кардиомиопатии и т. д. [9, 13]. Причины, по которым миокардиальный стресс вызывает пролиферацию гладкомышечных клеток эндокарда с трансформацией их в фибробласты с последующим синтезом коллагена и эластана, до настоящего времени до конца не установлены, но в экспериментах на животных было показано участие в данном процессе местных гуморальных взаимосвязей.

Особенности миокарда новорожденного ребенка обуславливают меньшую, чем в другие возрастные периоды, инотропную активность и склонность к быстрому развитию вентрикулярного дезадаптивного ремоделирования в виде дилатации камер сердца с формированием сферической формы миокарда, развитием эксцентрической гипертрофии левого желудочка, фиброзом и относительной недостаточностью атрио-вентрикулярных клапанов. Нарушение геометрии желудочков и их сферизация гемодинамически невыгодны, так как способствуют быстрому развитию сердечной недостаточности [12, 17].

В настоящее время патогенез кардитов нельзя рассматривать как однотипный, характерный для всех случаев. Наибольшее значение имеют три группы механизмов:

- 1) прямое воздействие возбудителя на кардиомиоциты (инфекционный, паренхиматозный миокардит), который наблюдается преимущественно при вирусных (энтеровирусных) инфекциях;
- 2) сосудистые поражения сердца, которые могут быть обусловлены эндотелиотропностью некоторых возбудителей (грипп, аденовирус, микоплазма и др.);
- 3) иммунологическое повреждение антителами и активированными лимфоцитами.

Клиника. *Ранние врожденные кардиты* возникают вследствие действия повреждающего агента (вирусы, бактерии, радиация и др.) на сердце плода в ранний фетальный период (4–7-й месяцы гестации). Ткани сердца плода в этот период отвечают реакцией пролиферации соединительной ткани, т. е. формированием фиброзной и эластической тканей. Ребенок рождается обычно уже с исходом кардита, нарушением сократительной функции сердца и дилатацией его полостей. Ведущие клинические симптомы – кардиомегалия, сердечная недостаточность (сначала левожелудочковая, затем тотальная), одышка, кашель [1, 3, 9].

Все клинические проявления заболевания можно разделить на внесердечные и сердечные. К экстракардиальным относятся: плохая прибавка массы тела без видимой причины, отставание в физическом развитии, задержка развития статических функций. Отмечаются вялость, сонливость, повышенная потливость, выраженная утомляемость при кормлении, срыгивания. При сосании у ребенка развивается афония в результате сдавления возвратного нерва увеличенными камерами сердца. Наблюдаются беспричинные приступы беспокойства, реже – эпизоды потери сознания. С первых дней жизни появляется кашель или навязчивое покашливание. На первом году жизни дети часто болеют (бронхит, пневмония и др.). При осмотре выявляются бледность кожных покровов, умеренная синюшность видимых слизистых оболочек, кончиков пальцев и цианоз носогубного треугольника. При аускультации легких на фоне жесткого дыхания выслушиваются разнокалиберные влажные хрипы.

При пальпации верхушечный толчок ослаблен. Перкуторно определяется увеличение границ сердечной тупости (преимущественно влево). Тоны сердца глухие, иногда аритмичные. Отмечается увеличение частоты сердечных сокращений, которое плохо поддается лечению. Развивается тотальная (с преобладанием левожелудочковой) сердечно-сосудистая недостаточность.

Симптомы сердечной декомпенсации обнаруживаются остро, как правило, на фоне какого-либо заболевания (чаще всего при острой респираторной инфекции – бронхите, пневмонии). Пациенты обычно поступают в клинику в крайне тяжелом состоянии и с явно выраженной застойной сердечной недостаточностью, имеют различные диагнозы: врожденный порок сердца, пневмония, сепсис.

Кардиомегалия выявляется уже в первые месяцы жизни в виде увеличения границ сердца во все стороны, больше влево и вверх, усиленного и разлитого верхушечного толчка, рано формирующегося сердечного горба (чаще левостороннего), который к 5–6-му месяцу жизни становится выраженным. Шумовая симптоматика не характерна, может выслушиваться систолический шум относительной митральной недостаточности, обусловленной выраженной дилатацией левого желудочка.

Сердечная недостаточность имеет систолодиастолический характер, т. е. связана как с резким нарушением контрактильности фибротически измененного, хоть и гипертрофированного левого желудочка, так и с диастолической ригидностью резко утолщенного и малорастяжимого в диастолу эндокарда. По мере прогрессирования сердечной недостаточности увеличиваются одышка в покое, ортопноэ, появляются влажные хрипы в нижних отделах легких, размеры печени увеличиваются на 2–3 см. Менее характерны для детей раннего возраста такие признаки правожелудочковой сердечной недостаточности, как набухание шейных вен и выраженные периферические отеки [12].

Поздние антенатальные миокардиты вызываются инфекцией, которая проникает в сердце плода после 7-го месяца гестации, когда ткани сердца плода уже могут отвечать полной воспалительной реакцией. В отличие от ранних врожденных миокардитов, такие изменения ткани сердца, как фиброэластоз и эластофиброз, при поздних миокардитах отсутствуют. Вместо них в миокарде имеются выраженные признаки воспаления, протекающего так же, как и у детей с приобретенными миокардитами. Ребенок может родиться как с текущим воспалительным процессом, так и с исходом кардита.

Клинические проявления заболевания при рождении могут иметь разную степень выраженности, что обусловлено сроками инфицирования плода по отношению к периоду родов, а также тяжестью поражения миокарда. Ребенок обычно рождается с нормальной массой тела и первые 2 мес. прибывает в весе, но начиная с 3-го месяца жизни темпы прибавки массы тела резко снижаются. Такой характерный симптом сердечной недостаточности, как одышка при кормлении, крике, может быть выявлена уже при рождении. Кожные покровы бледные. Ребенок постепенно начинает отставать в психомоторном и физическом развитии, а новые навыки усваивает с трудом.

При текущем миокардите дети плохо сосут, они вялые или беспокойные. Появляются симптомы сердечной недостаточности (одышка, тахикардия, увеличение печени). Частыми спутниками поздних врожденных кардитов являются изменения ЦНС, проявляющиеся в виде приступов беспокойства, акроцианоза, судорог. Иногда такой приступ может закончиться кратковременной потерей сознания. Сочетанное поражение сердца и ЦНС характерно для кардитов, вызванных вирусами группы Коксаки [10, 17].

При аускультации в сердце выслушиваются приглушенные тона, ослабленный I тон на верхушке, систолический шум на верхушке и в 5-й точке. Отмечаются различные нарушения ритма и проводимости. На ЭКГ, кроме аритмий, регистрируются стойкие нарушения процессов реполяризации, увеличение электрической активности левого желудочка. Все клинические симптомы и данные ЭКГ меняются в динамике и при адекватном своевременном лечении полностью обратимы.

При рентгенографии и УЗИ сердца может быть обнаружено небольшое расширение левого желудочка. Лабораторные показатели крови в пределах нормы. В случае инфицирования плода незадолго до родов могут быть выявлены изменения в биохимическом анализе крови: диспротеинемия, увеличение α_2 -фракции глобулинов, повышение уровня сиаловых кислот и креатинфосфокиназы (КФК) [5, 6].

Диагностика. Диагностика врожденного кардита зависит в основном от клинических данных (приведены выше) и результатов инструментального обследования. Однако во многих случаях она затруднена, поэтому возможны как ложноположительные, так и ложноотрицательные диагнозы.

Первые признаки сердечной патологии при обоих вариантах антенатальных кардитов появляются в первые 6 мес. жизни (реже на 2–3-м году).

Диагноз врожденного кардита можно считать достоверным, если симптомы сердечной патологии выявляются внутриутробно или в роддоме, вероятным – если они возникают в первые месяцы жизни ребенка и им не предшествовали интеркуррентные заболевания и/или имелись анамнестические данные о болезни матери во время беременности.

Для подтверждения диагноза в комплексном обследовании ребенка используются лабораторные, инструментальные и патоморфологические методы диагностики.

Электрокардиография является обязательным методом обследования при врожденном кардите. На ЭКГ регистрируются низко- или высоковольтные комплексы с признаками гипертрофии левого предсердия и левого желудочка, часто с глубокими зубцами Q в отведениях II, III, AVF, V5–V6. Гипертрофия, вероятно, носит компенсаторный характер. Характерны изменения реполяризации в виде инверсии сегмента ST в «левых» отведениях, что, предположительно, связано с ишемией субэндокардиальных слоев миокарда. Возможны нарушения внутрижелудочковой проводимости. Отмечаются увеличение частоты сердечных сокращений, ригидный ритм [3, 18, 19].

Врожденный эластофиброз, в отличие от фиброэластоза, характеризуется высоким вольтажом желудочкового комплекса. При этом уменьшение частоты сердечных сокращений и ригидность ритма с возрастом и на фоне лечения свидетельствуют о более благоприятном течении заболевания.

Рентгенография грудной клетки. Выявляется усиление легочного рисунка за счет венозного застоя. Сердце, как правило, значительно увеличено в поперечнике (кардиоторакальный индекс более 60 %) в основном за счет левого желудочка. Для эластофиброза характерна шаровидная или овоидная тень сердца на рентгенограмме, а при фиброэластозе – трапециевидная его форма со сглаженной «талией», напоминающая таковую при выпотном перикардите [3, 15].

Эхокардиография. Определяются уплотнение экосигнала от эндокарда, значительная дилатация левых отделов сердца, гипокинезия межжелудочковой перегородки, смещение митрального клапана к задней стенке левого желудочка. Кроме того, отмечается резкое уменьшение фракции выброса (ниже 45–50 %) [11].

Магнитно-резонансная томография (МРТ) сердца. С помощью МРТ обеспечивается неинвазивный анализ характеристик миокардиальной ткани и возможна диагностика миокардита. В арсенале МРТ имеется ряд импульсных последовательностей и методик, позволяющих выявить и оценить процесс воспаления на различных его фазах. В частности, для выявления отека миокарда в острой фазе воспаления обязательным является использование T2-взвешенных изображений. Наряду с ними протокол исследования пациентов с острым миокардитом должен включать T1-взвешенные изображения [12, 19].

Лабораторные методы диагностики. При ранних врожденных кардитах лабораторные показатели крови в норме. Результаты анализов крови при поздних врожденных кардитах обусловлены сроками инфицирования плода к моменту родов [8, 20]. В случае инфицирования незадолго до родов могут быть выявлены изменения в биохимическом анализе крови: диспротеинемия, увеличение α_2 -фракции глобулинов, повышение уровней сиаловой кислоты и КФК, положительный С-реактивный белок. Основное внимание уделяется маркерам неспецифического поражения миокарда: повышению уровней КФК (особенно МВ фракции), сердечной фракции тропонина, лактатдегидрогеназы. Сердечные тропонины (TnI, TnT) обладают большей чувствительностью, чем креатинкиназа, однако не являются специфичными, и их нормальное значение не исключает наличие миокардита [21]. Это также относится к другим кардиальным маркерам: мозговому натрийуретическому пептиду (BNP), циркулирующим цитокинам, маркерам, связанным с экстрацеллюлярной деградацией матрикса, и новым биомаркерам (пентраксин 3, галектину 3 и фактору роста дифференциации).

Серологические методы. Для дифференциальной диагностики миокардитов эти методы не следует применять в качестве рутинных [22, 23]. Это обусловлено тем, что инфицирование происходит обычно задолго до рождения, когда острая фаза миокардита уже завершилась [24].

Согласно критериям Нью-Йоркской кардиологической ассоциации, возникновение изменений на ЭКГ впервые после перенесенной вирусной инфекции, при наличии повышения

активности в крови лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и КФК считается достаточным для постановки диагноза «миокардит». При этом увеличение размеров сердца и наличие клинических симптомов сердечной недостаточности свидетельствуют о достоверности диагноза [4, 9].

Морфологическая характеристика миокардитов учитывает разные типы воспалительного процесса: альтеративный (дистрофически-некробиотический) и экссудативно-пролиферативный с преимущественными изменениями кардиомиоцитов (паренхиматозный вариант) или стромы миокарда (интерстициальный вариант) [3]. По распространенности морфологических изменений различают очаговые и диффузные миокардиты.

Обязательным морфологическим признаком ранних кардитов является фиброэластоз или эластофиброз эндомиокарда, поздние врожденные кардиты не имеют этого признака [1]. Большое количество эластической ткани ретроспективно указывает на повреждение сердца в ранний фетальный период (4–7-й месяц внутриутробного развития), когда ткани плода отвечают на повреждение пролиферацией с развитием эластоэластоза или фиброза [2, 4, 16]. При поражении сердца после 7-го месяца (поздняя фетопатия) наблюдается обычная воспалительная реакция.

Макроскопически при ранних врожденных кардитах обнаруживается кардиомегалия с дилатацией и умеренной гипертрофией миокарда левого желудочка, его эндокард значительно утолщен. При гистологическом изучении определяется диффузное утолщение эндокарда (преимущественно за счет эластических волокон) и отсутствие признаков воспаления (врожденный фиброэластоз эндомиокарда). В других случаях в основном преобладают коллагеновые структуры (эластических меньше) в сочетании с клеточными инфильтратами – постмиокардитический эластофиброз. Связь между степенью утолщения эндокарда и тяжестью клинических проявлений болезни отсутствует, но клиническая тяжесть всецело зависит от выраженности миокардиальных изменений [25]. Очаги склероза и признаки активного воспаления в других паренхиматозных органах при обоих видах изолированного фиброэластоза позволяют предположить наличие генерализованной внутриутробной инфекции, одним из фрагментов которой является поражение сердца. Почти у 2/3 больных имеется поражение клапанного аппарата [26].

Дифференциальная диагностика. Своевременно установить диагноз бывает очень сложно. Помогает анамнез (наличие внутриутробной инфекции и заболеваний матери) и наблюдение в динамике (прогрессирование клинических проявлений при антенатальном миокардите). Кроме того, для врожденного кардита характерны такие нарушения ритма сердца и проводимости, как полная атриовентрикулярная блокада, трепетание и мерцание предсердий, полные блокады ножек пучка Гиса, которые не имеют обратного развития и не поддаются консервативной терапии.

Диагностика и дифференциальная диагностика чаще всего затруднены в тех случаях, когда миокардит протекает в легкой форме со скудной симптоматикой. Однако в большинстве случаев на основании учета всех признаков заболевания правильная и своевременная диагностика вполне возможна [20, 22, 27].

К заболеваниям сердечно-сосудистой системы, ошибочно принимаемым за врожденный кардит у грудных детей, относятся:

1. Врожденные пороки сердца, не сопровождающиеся аускультативной симптоматикой.
2. Постгипоксический синдром дезадаптации сердечно-сосудистой системы.
3. Транзиторная гипертрофия или дилатация миокарда в результате «родового стресса» на фоне гипоксии.
4. Медикаментозно обусловленные морфофункциональные повреждения миокарда.
5. Эндокринные заболевания и патология миокарда у детей.
6. Аномальное отхождение левой коронарной артерии (синдром Бланда–Уайта–Гарленда).
7. Митохондриальные кардиомиопатии.
8. Нарушения сердечного ритма и проводимости.
9. Наследственные и генетически обусловленные заболевания.

Исходы и прогноз. При ранних врожденных кардитах прогноз плохой. Заболевание протекает, как правило, тяжело и приводит к летальному исходу в первые годы и даже месяцы жизни. Дети редко доживают до 4 лет, большинство из них умирают в первые месяцы жизни от реф-

рактерной прогрессирующей сердечной недостаточности, особенно при присоединении острых респираторно-вирусных инфекций или пневмонии.

Исходами поздних врожденных кардитов бывают стойкие нарушения ритма или проводимости, которые можно обнаружить уже в периоде новорожденности. Нередко встречаются экстрасистолия, трепетание предсердий, пароксизмальная или непароксизмальная тахикардия, атриовентрикулярные блокады I–III степени, блокады ножек пучка Гиса, синдром слабости синусового узла [2, 11, 18]. Если диагноз не поставлен вовремя, процесс становится подострым, а затем хроническим, появляются необратимые изменения в миокарде (кардиосклероз, миокардиодистрофия, стойкие аритмии), которые определяют прогноз заболевания. При хронизации процесса постепенно снижается сократительная функция миокарда, нарастает сердечная недостаточность. Дети, вовремя не получившие необходимую терапию, довольно быстро погибают.

При своевременном лечении болезни возможно как полное выздоровление пациента, так и хроническое течение заболевания без прогрессирования сердечных изменений.

Список использованных источников

1. Белоконь, Н. А. Болезни сердца и сосудов у детей : в 2 т. / Н. А. Белоконь, М. Б. Кубергер. – М. : Медицина, 1987. – Т. 2.
2. Белозеров, Ю. М. Детская кардиология / Ю. М. Белозеров. – М. : МЕДпресс-информ, 2004. – 600 с.
3. Мутафьян, О. А. Кардиты у детей и подростков / О. А. Мутафьян. – СПб. : СПбМАПО, 2006. – 288 с.
4. Беляева, Л. М. Сердечно-сосудистые заболевания у детей и подростков / Л. М. Беляева, Е. К. Хрусталева. – Минск : Выш. шк., 2003. – 364 с.
5. Терещенко, С. Н. Клинические рекомендации по диагностике и лечению миокардитов / С. Н. Терещенко, Г. П. Арутюнов, С. Р. Гиляревский // Евраз. кардиол. журн. – 2015. – №3. – С. 3–17.
6. Japanese Circulation Society (JCS) Joint Working Group. Guidelines for diagnosis and treatment of myocarditis (JCS 2009) // *Circ. J.* – 2011. – N 75. – P. 734–743.
7. Rose, N. R. Myocarditis: infection versus autoimmunity / N. R. Rose // *Clin. Immunol.* – 2009. – Vol. 29, N 6. – P. 730–737.
8. Шабалов, Н. П. Детские болезни : в 2 т. / Н. П. Шабалов. – 6-е изд. – СПб. : Питер, 2011. – Т. 2. – С. 49–52.
9. Ивкина, С. С. Неревматические кардиты у детей / С. С. Ивкина, А. И. Зарянкина. – Гомель : ГГМУ, 2012. – 24 с.
10. Interferon-beta improves survival in enterovirus-associated cardiomyopathy / U. Kühl [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2012. – N 60. – P. 1295–1296.
11. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease / L. T. Cooper [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2007. – Vol. 28, N 24. – P. 3076–3093.
12. Садыкова, Д. И. Неревматические кардиты / Д. И. Садыкова, Н. Н. Архипова // *Практ. медицина.* – 2010. – №5. – С. 55–60.
13. Yoshikawa, T. Autoimmune mechanisms underlying dilated cardiomyopathy / T. Yoshikawa, A. Baba, Y. Nagatomo // *Circ. J.* – 2009. – Vol. 73, N 4. – P. 602–607.
14. Практическое руководство по детским болезням. Т. 3: Кардиология и ревматология детского возраста / под ред. Г. А. Самсыгиной, М. Ю. Щербаковой. – М. : Медпрактика-М, 2009. – 812 с.
15. Dennert, R. Acute viral myocarditis / R. Dennert, H. J. Crijs, S. Heymans // *Eur. Heart J.* – 2008. – Vol. 29, N 17. – P. 2073–2082.
16. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis / I. Kindermann [et al.] // *Circulation.* – 2008. – Vol. 118, N 6. – P. 639–648.
17. Фетальные и неонатальные нарушения сердечного ритма и проводимости / Н. П. Котлукова [и др.] // *Педиатрия.* – 2007. – №2. – С. 5–12.
18. Prognostic electrocardiographic parameters in patients with suspected myocarditis / C. Ukena [et al.] // *Eur. J. Heart. Fail.* – 2011. – N 13. – P. 398–405.
19. Трудности диагностики неревматического миокардита. Клиническое наблюдение / Н. В. Кирьянова [и др.] // *Перм. мед. журн.* – 2016. – Т. 33, №1. – С. 103–110.
20. Беляева, Л. М. Педиатрия / Л. М. Беляева. – М. : Мед. лит., 2011. – 542 с.
21. Kaya, Z. Cardiac troponins and autoimmunity: their role in the pathogenesis of myocarditis and of heart failure / Z. Kaya, H. A. Katus, N. R. Rose // *Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 134, N 1. – P. 80–88.
22. Fcγ-receptor IIa polymorphism and the role of immunoadsorption in cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy / A. Staudt [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2010. – Vol. 87, N 4. – P. 452–458.
23. Virus serology in patients with suspected myocarditis: utility or futility? / F. Mahfoud [et al.] // *Eur. Heart. J.* – 2011. – Vol. 32, N 7. – P. 897–903.
24. She, R. C. Utility of immunofluorescence and electron microscopy in endomyocardial biopsies from patients with unexplained heart failure / R. C. She, E. H. Hammond // *Cardiovasc. Pathol.* – 2010. – Vol. 19, N 4. – P. 99–105.

25. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis / A. L. Caforio [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2007. – Vol. 28, N 11. – P. 1326–1333.
26. Viral causes of human myocarditis / L. Andreoletti [et al.] // *Arch. Cardiovasc. Dis.* – 2009. – Vol. 102, N 6/7. – P. 559–568.
27. Cooper, L. T. Myocarditis / L. T. Cooper // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 360, N 15. – P. 1526–1538.

References

1. Belokon' N. A., Kuberg M. B. *Diseases of the heart and blood vessels in children: a guide for doctors*: in 2 vol. Moscow, Meditsina Publ., 1987. Vol. 2 (in Russian).
2. Belozеров Yu. M. *Pediatric cardiology*. Moscow, MEDpress-inform Publ., 2004. 600 p. (in Russian).
3. Mutaḑ'ian O. A. *Carditis in children and adolescents*. St. Petersburg, SPbMAPO Publ., 2006. 288 p. (in Russian).
4. Belyaeva L. M., Khrustaleva E. K. *Cardiovascular diseases in children and adolescents*. Minsk, Vyshejschaja shkola Publ., 2003. 364 p. (in Russian).
5. Tereshchenko S. N., Arutyunov G. P., Giliarevskii S. R. Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of myocarditis. *Evraziiskii kardiologicheskii zhurnal* [Eurasian Cardiology Journal], 2015, no. 3, pp. 3–17 (in Russian).
6. Japanese Circulation Society (JCS) Joint Working Group. Guidelines for diagnosis and treatment of myocarditis (JCS 2009). *Circulation Journal*, 2011, no. 75, pp. 734–743.
7. Rose N. R. Myocarditis: infection versus autoimmunity. *Clinical Immunology*, 2009, vol. 29, no. 6, pp. 730–737. DOI: 10.1007/s10875-009-9339-z
8. Shabalov N. P. *Children's diseases*, in 2 vol., 6th ed. St. Petersburg, Piter Publ., 2011, vol. 2, pp. 49–52 (in Russian).
9. Ivkina S. S., Zariankina A. I. *Non-rheumatic carditis in children*. Gomel, Gomel'skii gosudarstvennyi meditsinskii universitet Publ., 2012. 24 p. (in Russian).
10. Kühl U., Lassner D., von Schlippenbach J., Poller W., Schultheiss H. P. Interferon-beta improves survival in enterovirus-associated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 2012, no. 60, pp. 1295–1296. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.06.026
11. Cooper L. T., Baughman K. L., Feldman A. M., Frustaci A., Jessup M., Kuhl U., Levine G. N., Narula J., Starling R. C., Towbin J., Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease : a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, 2007, vol. 28, no. 24, pp. 3076–3093. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.09.008
12. Sadykova D. I., Arkhipova N. N. Non-rheumatic carditis. *Prakticheskaya meditsina* [Practical Medicine], 2010, no. 5, pp. 55–60 (in Russian).
13. Yoshikawa, T., Baba A., Nagatomo Y. Autoimmune mechanisms underlying dilated cardiomyopathy. *Circulation Journal*, 2009, vol. 73, no. 4, pp. 602–607.
14. *Practical guidance on childhood diseases. Vol. 3: Cardiology and rheumatology of childhood*. Ed. by G. A. Samsygina, M. Yu. Shcherbakova. Moscow, Medpraktika-M Publ., 2009. 812 p. (in Russian).
15. Dennert R., Crijns H. J., Heymans S. Acute viral myocarditis. *European Heart Journal*, 2008, vol. 29, no. 17, pp. 2073–2082. DOI: 10.1093/eurheartj/ehn296
16. Kindermann I., Kindermann M., Kandolf R., Klingel K., Bültmann B., Müller T., Lindinger A., Böhm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation*, 2008, vol. 118, no. 6, pp. 639–648. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.769489
17. Kotlukova N. P., Khuzina O. M., Nemirovskii V. B., Matiunina E. A. Fetal and neonatal disorders of cardiac rhythm and conduction. *Pediatrics*, 2007, vol. 86, no. 2, pp. 5–12 (in Russian).
18. Ukena C., Mahfoud F., Kindermann I., Kandolf R., Kindermann M., Böhm M. Prognostic electrocardiographic parameters in patients with suspected myocarditis. *European Journal of Heart Failure*, 2011, no. 13, pp. 398–405. DOI: 10.1093/eurjhf/hfq229
19. Kir'ianova N. V., Babushkina G. D., Mikhailovskaya L. V., Borodina E. N., Babushkina L. V., Kir'ianova T. V., Shavrin A. P. Difficulties in diagnosing nonrheumatic myocarditis. Clinical observation. *Perm Medical Journal*, 2016, vol. 33, no. 1, pp. 103–110 (in Russian).
20. Beliaeva L. M., Voitova E. V., Kozharskaya L. G., Kolupaeva E. A., Korol' S. M., Malevanaya I. A., Mikul'chik N. V., Khrustaleva E. K., Chizhevskaya I. D. *Pediatrics*. Moscow, Meditsinskaya literatura Publ., 2011. 568 p. (in Russian).
21. Kaya, Z., Katus H. A., Rose N. R. Cardiac troponins and autoimmunity: their role in the pathogenesis of myocarditis and of heart failure. *Clinical Immunology*, 2010, vol. 134, no. 1, pp. 80–88. DOI: 10.1016/j.clim.2009.04.008
22. Staudt A., Herda L. R., Trimpert C., Lubenow L., Landsberger M., Dörr M., Hummel A., Eckerle L. G., Beug D., Müller C., Hoffmann W., Weitmann K., Klingel K., Kandolf R., Kroemer H. K., Greinacher A., Felix S. B. Fcγ-receptor IIa polymorphism and the role of immunoadsorption in cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2010, vol. 87, no. 4, pp. 452–458. DOI: 10.1038/clpt.2009.246
23. Mahfoud F., Gärtner B., Kindermann M., Ukena C., Gadowski K., Klingel K., Kandolf R., Böhm M., Kindermann I. Virus serology in patients with suspected myocarditis: utility or futility? *European Heart Journal*, 2011, vol. 32, no. 7, pp. 897–903. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq493

24. She R. C., Hammond E. H. Utility of immunofluorescence and electron microscopy in endomyocardial biopsies from patients with unexplained heart failure. *Cardiovascular Pathology*, 2010, vol. 19, no. 4, pp. 99–105. DOI: 10.1016/j.carpath.2009.04.004

25. Caforio A. L., Calabrese F., Angelini A., Tona F., Vinci A., Bottaro S., Ramondo A., Carturan E., Iliceto S., Thiene G., Daliento L. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *European Heart Journal*, 2007, vol. 28, no. 11, pp. 1326–1333. DOI: 10.1093/eurheartj/ehm076

26. Andreoletti L., Lévêque N., Boulagnon C., Brasselet C., Fornes P. Viral causes of human myocarditis. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 2009, vol. 102, no. 6/7, pp. 559–568. DOI: 10.1016/j.acvd.2009.04.010

27. Cooper L. T. Myocarditis. *New England Journal of Medicine*, 2009, vol. 360, pp. 1526–1538. DOI: 10.1056/NEJMra0800028

Информация об авторах

Вязова Людмила Иосифовна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь).

Башлакова Алла Николаевна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alla.bashlakova@gmail.com.

Information about the authors

Liudmila I. Viazova – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus).

Ala N. Bashlakova – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alla.bashlakova@gmail.com.

Н. В. Марацкая, М. Г. Девялтовская, Ю. Ю. Бучель, Е. А. Улезко

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Республика Беларусь

МЕТОДЫ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ

Аннотация. Методы нейровизуализации играют все более заметную роль в диагностике патологических изменений головного мозга. В детской неврологии и нейрохирургии для непосредственной визуализации структур головного мозга используются нейросонография, рентгеновская компьютерная томография и магнитно-резонансная компьютерная томография. Они являются современными высокоточными методами диагностики, позволяющими оценить структурные изменения в тканях мозга и определить состояние ликвородинамического пространства.

Визуализация структур головного мозга особенно актуальна в раннем возрасте, поскольку большое количество новорожденных и грудных детей имеют патологические изменения головного мозга, идентификация которых принципиально меняет характер проводимого лечения. Диагностика различных заболеваний у детей особенно актуальна на ранних стадиях заболевания, что позволяет определять стратегию и тактику лечения и применять соответствующее лечение.

Выбор метода нейровизуализации у детей с патологией головного мозга определяется как клиническими показаниями для проведения исследования, так и разрешающими возможностями методов.

Ключевые слова: головной мозг, центральная нервная система, дети, рентгеновская компьютерная томография, магнитно-резонансная компьютерная томография, нейросонография, перинатальный период

Для цитирования: Методы нейровизуализации в диагностике патологических изменений головного мозга у детей / Н. В. Марацкая [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 120–128.

N. V. Maratskaya, M. G. Devyaltovskaya, Yu. Yu. Buchel, E. A. Ulezko

Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child”, Minsk, Republic of Belarus

METHODS OF NEUROISIZATION IN DIAGNOSIS OF PATHOLOGICAL CHANGES IN THE CHILDREN’S BRAIN

Abstract. Currently, the methods of neuroimaging become crucial for the diagnosis of pathological changes in the brain. The children’s neurology and neurosurgery use neurosonography, X-ray computed tomography and magnetic resonance computed tomography for immediate visualization of brain structures. These are modern high-precision diagnostic methods that allow one to assess structural changes in brain tissues and determine the state of liquorodynamic space.

Visualization of brain structures is necessary at an early age, since a large number of newborns and infants have pathological changes in the brain, the identification of which fundamentally changes the nature of therapy. Diagnosis of various diseases in children is especially important in the early stages of disease, which permits one to determine the strategy and tactics of treatment and to apply appropriate therapy. The choice of the method of neuroimaging for children with brain pathology is determined both by clinical indications and by the resolving capabilities of the method.

Keywords: brain, central nervous system, children, computed tomography, magnetic resonance imaging, neurosonography, perinatal period

For citation: Maratskaya N. V., Devyaltovskaya M. G., Buchel Yu. Yu., Ulezko E. A. Methods of neuroisization in diagnosis of pathological changes in the children’s brain. *Vesti Natsyonal’noi akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 120–128 (in Russian).

В работе представлены результаты обзора отечественной и зарубежной литературы о применении различных методов нейровизуализации для выявления патологических изменений головного мозга у детей.

Клинические последствия перинатальных поражений центральной нервной системы (ЦНС) являются темой острых дискуссий педиатров, неонатологов и неврологов на протяжении многих десятилетий [1, 2]. Перинатальные поражения ЦНС – одна из основных причин нарушения соматического здоровья, отклонений физического и нервно-психического развития детей как в первый год их жизни, так и в последующие периоды детства [3].

Роль перинатальных поражений ЦНС в формировании детской патологии сложно переоценить: в структуре детской инвалидности поражения нервной системы составляют около 50 %, при этом 70–80 % случаев приходится на перинатальные поражения [4].

В настоящее время принято выделять следующие виды перинатальных поражений мозга: 1) травматические повреждения; 2) гипоксически-ишемическую энцефалопатию; 3) инфекционные поражения мозга и его оболочек; 4) врожденные аномалии развития мозга; 5) дисметаболические поражения ЦНС. Геморрагические поражения ЦНС имеют отношение сразу к нескольким видам поражений, так как гипоксия не только является основной причиной возникновения внутричерепных кровоизлияний, но и, как правило, сопровождается травматическими повреждениями [1, 5].

Наиболее частой причиной перинатальных повреждений ЦНС (47 %) являются гипоксически-ишемические поражения мозга [5].

Далее причины перинатальных повреждений мозга в зависимости от частоты встречаемости целесообразно распределить следующим образом: аномалии и дисплазии мозга – 28 %, TORCH-инфекции – 19, родовая травма – 4, наследственные болезни обмена – 2 % [1, 5].

Аномалии развития головного мозга – одна из частых причин появления неврологической симптоматики у новорожденных и детей первых лет жизни [6].

Неврологическая симптоматика аномалий развития головного мозга зависит от их локализации и объема поражения. На степень неврологических расстройств может влиять архитектура тканей головного мозга (мальпозиция и мальориентация). Клиническая симптоматика аномалий развития головного мозга малоспецифична. Чем тяжелее повреждения мозга, тем ярче неврологическая симптоматика и тем раньше она проявляется [6, 7].

Вопрос о ранней диагностике различных форм поражения головного мозга у новорожденных и грудных детей остается одной из актуальных проблем неонатологии и педиатрии. Трудность топической диагностики объясняется анатомической и функциональной незрелостью ЦНС и неспецифической полиморфной реакцией мозга в ответ на различные патологические процессы [8–10].

Исследования педиатров и детских неврологов, особенно в последние годы, все более убеждают в том, что точная диагностика повреждений нервной системы может и должна осуществляться на самых ранних сроках – только тогда возможны эффективная терапия и реальная профилактика более поздних осложнений [11].

Решающее значение в диагностике и прогнозе тяжести течения заболевания в настоящее время приобретают методы нейровизуализации. Активное развитие и внедрение современных методов нейровизуализации в практику невролога позволило расширять диагностику церебральных нарушений, оценивать их влияние на неврологический и психический статус, определять стратегию и тактику лечения, контролировать его эффективность, прогнозировать дальнейшее развитие ребенка и исход заболевания, расширять возможности медико-генетического консультирования [12–16].

В настоящее время в детской неврологии и нейрохирургии для непосредственной визуализации структур головного мозга используют три метода лучевой диагностики: нейросонографию (НСГ), рентгеновскую компьютерную томографию (РКТ) и магнитно-резонансную компьютерную томографию (МРТ) [15, 16]. Они относятся к современным высокоточным методам диагностики, которые дают возможность оценить структурные изменения в тканях мозга и определить состояние ликвородинамического пространства [17, 18].

Для оценки эффективности методов измерения в диагностике применяют ряд критериев, главными из которых являются [19]:

1) точность измерения – соответствие результатов измерения истинному значению определяемой величины (высокая точность измерения достигается при случайных минимальных и систематических погрешностях);

2) правильность измерения (это качество измерения характеризует величину систематических погрешностей – чем они меньше, тем более правильным оказывается измерение);

3) сходимость измерений (данное качество измерений характеризует величину случайных ошибок – чем они меньше, тем лучше сходимость измерений; этот критерий показывает, насколько близки между собой результаты измерений, выполненных в одинаковых условиях, т. е. в одной и той же лаборатории, на одном и том же приборе, одним методом);

4) воспроизводимость измерений (этот критерий показывает, насколько близки между собой результаты измерений, выполненных в различных условиях, т. е. в разных лабораториях или на разных аппаратах или разными исследователями) [20, 21].

Одним из наиболее доступных и широко используемых методов визуализации головного мозга является НСГ, с помощью которой возможно оценить макроструктуру и экзогенность мозгового вещества, размеры и форму ликворных пространств. Метод позволяет объективизировать структурные изменения головного мозга у новорожденных в тех случаях, когда применения рутинных анамнестического и клиничко-неврологического методов может быть недостаточно для постановки диагноза [13, 14]. Кроме того, НСГ позволяет уже в первые сутки диагностировать признаки перивентрикулярной лейкомаляции, предположить наличие пери- или интравентрикулярного кровоизлияния и уточнить его степень [22].

Термин «нейросонография» дословно переводится как изображение нервной системы с помощью ультразвука (греч. *neuron* – нервная ткань, лат. *sonus* – звук, греч. *grapho* – изображать). Сегодня существуют два варианта трактовки этого термина, принципиально отличающихся друг от друга.

Первый вариант: нейросонография – это отдельная методика исследования головного мозга младенца через открытый передний родничок [15, 23].

Второй вариант: нейросонография – это группа методик, позволяющих оценить состояние нервной системы новорожденных, детей и взрослых с помощью ультрасонографии (УС) (например, УС скальпа, УС черепа, УС головного мозга, УС позвоночника и спинного мозга, УС мозговых грыж, доплерография и интраоперационная УС (методы УС-нейронавигации)). Наиболее широко в клинической практике используется УС головного мозга. В зависимости от используемых ультразвуковых «окон» методики УС головного мозга можно разделить на три группы: а) чрезродничковая УС; б) транскраниальная УС (через височную кость); в) УС через костные дефекты (врожденные или сформированные во время нейрохирургических операций) [24, 25].

В зависимости от состояния большого родничка возможно использование:

чрезродничковой методики (до закрытия большого родничка);

транскраниальной методики (после закрытия большого родничка, в том числе у детей старшего возраста и взрослых).

Для диагностики заболеваний головного мозга ультразвук начали применять с 1970-х годов сначала у недоношенных новорожденных. При этом было предложено в качестве ультразвукового «окна» использовать большой родничок. С тех пор чрезродничковое ультразвуковое исследование головного мозга является основным диагностическим методом, применяемым у младенцев.

Эта методика, предложенная E. G. Grant в 1986 г., в дальнейшем была модифицирована многими отечественными и зарубежными авторами [26].

НСГ обладает рядом очевидных преимуществ. Отсутствие лучевой нагрузки и необходимости предварительной подготовки пациента к обследованию, простота и неинвазивность, возможность многоплоскостного исследования и быстрота получения информации делают этот метод предпочтительным для первичной оценки структур мозга у детей до года. К достоинствам НСГ следует также отнести возможность интраоперационного исследования и осуществления мониторинга в послеоперационном периоде, полное отсутствие противопоказаний, возможность ее проведения с любой частотой и в любых условиях [27].

Сканирование головного мозга у детей, находящегося в тяжелом состоянии, можно проводить в кувезах, палатах и боксах, где находится ребенок. Тяжесть состояния не является противопоказанием для проведения исследования [8].

Однако традиционное чрезродничковое исследование не позволяет адекватно оценить состояние межполушарной щели, наружных ликворных пространств и оболочек мозга на всем протяжении. Закрытие большого родничка делает невозможным дальнейшее проведение обследований [28].

Стандартная УС головы младенца объективно отражает нормальную архитектуру головного мозга у детей до года и выявляет структурные внутричерепные изменения любой локализации.

Ввиду высоких показателей точности (94,7 %), чувствительности (96,7 %) и специфичности (85,7 %) стандартной УС головы младенца возможно ее использование для первичной оценки характера и локализации структурных внутричерепных изменений у детей первого года жизни.

Транскраниальная УС permet визуализировать, идентифицировать и выявлять структурные изменения в полости черепа супратенториальной локализации, адекватно оценивать состояние желудочковой системы, субарахноидального пространства и тканей.

Учитывая высокие показатели точности (92 %), чувствительности (89,4 %) и специфичности (95,4 %) транскраниальной УС, возможно ее использование в качестве скрининга для оценки состояния структур головного мозга у детей до года (с условием открытого большого родничка).

Наиболее эффективным является использование УС в сочетании с тщательной оценкой клинических проявлений в виде клинично-сонографического скрининга и клинично-сонографического мониторинга [29, 30]. В настоящее время нейросонография рассматривается в основном как скрининговый метод, с помощью которого выделяется группа детей, которые подлежат более глубокому РК-, МР-, протонно-спектроскопическому обследованию.

Сочетание современной рентгеновской и вычислительной техники обусловило создание принципиально нового метода – РКТ, с помощью которой можно получать послойное (через каждые 1–10 мм) изображение исследуемого объекта в аксиальной плоскости. Более сложные конструкции аппаратов для КТ позволяют получать изображения срезов и в других плоскостях.

РКТ, предложенная английским физиком Хаунсфилдом, в клинической практике впервые была применена в 1972 г. Компьютерный томограф соединяет в себе точную механику, электронику, вычислительную технику, уникальное по сложности математическое обеспечение, сверхстабильную рентгенотехнику.

В настоящее время стандартом РКТ является обследование с помощью многосрезового томографа с возможностью получения от 4 до 128 срезов с временным разрешением 0,1–0,5 (минимально доступная длительность одного оборота рентгеновской трубки составляет 0,3). Таким образом, длительность томографии всего тела с толщиной среза менее 1 мм составляет около 10–15 с, а результатом исследования являются от нескольких сотен до нескольких тысяч изображений. Фактически современная многосрезовая КТ является методикой объемного исследования всего тела человека, так как полученные аксиальные томограммы составляют трехмерный массив данных, позволяющий выполнить любые реконструкции изображений, в том числе многоплоскостные реформации, виртуальные эндоскопии, объемный рендеринг.

Применение контрастных препаратов при РКТ дает возможность повысить точность диагностики, а во многих случаях это является обязательным компонентом исследования. Для увеличения контрастности тканей применяют водорастворимые ионные и неионные йодсодержащие контрастные вещества. Высокая скорость сканирования, уменьшение толщины среза, необходимость четкой дифференциации сосудистых структур предъявляют новые требования к контрастным препаратам, что выражается в создании веществ с более высокой концентрацией йода и меньшей вязкостью.

Преимущества РКТ по сравнению с другими диагностическими методами компенсируют имеющиеся недостатки, что определяет высокую клиническую значимость метода [12, 31].

Основным преимуществом РКТ в сравнении с рентгенологическим исследованием является способность разделить объекты в соответствии с их расположением в направлении хода луча, т. е. избежать пространственного наложения. Второе важное преимущество – количественное измерение плотности тканей, что позволяет дифференцировать даже незначительно отличающиеся по плотности объекты. Недостатками РКТ являются более высокая доза облучения и стоимость проведения исследования. Так, доля КТ-исследований среди всех рентгенодиагностических процедур не превышает 4 %, однако их вклад в коллективную дозу облучения населения в некоторых странах достигает 40 %. Поэтому действующий в традиционной рентгенодиагностике принцип ALARA (*As low as reasonably achievable*), согласно которому доза облучения должна быть настолько низкой, насколько это возможно, – еще более актуален для РКТ.

В РКТ существует еще одно положение: доза облучения и качество изображения напрямую связаны друг с другом. При повышении дозы облучения качество КТ-изображения улучшается, при снижении – ухудшается. Поэтому для РКТ вышеприведенный принцип можно сформулировать так: доза облучения должна быть настолько низкой, насколько это возможно без снижения качества изображений ниже приемлемого уровня.

Основными показателями качества КТ-изображения являются: уровень шума, однородность, отсутствие артефактов, пространственная разрешающая способность, контрастная разрешающая способность [32].

РКТ является важной специальной методикой лучевого исследования, применение которой позволяет существенно повысить информативность рентгенологической диагностики заболеваний у детей [10, 33].

Для правильной оценки анатомических структур и выявления возможных аномалий необходимо хорошее пространственное разрешение, для чего в большинстве случаев следует выбирать срезы небольшой толщины (0,2–0,5 см) у новорожденных и детей первого года жизни, учитывая небольшой размер их головного мозга. При необходимости уточнения обнаруженных изменений в изучаемой области можно получать срезы толщиной 1 мм. При подозрении на опухоли, артериовенозные мальформации, а также при выявлении капсулы абсцесса может проводиться повторное обследование с применением контрастных препаратов. Новорожденным компьютерную томографию можно проводить после кормления без наркоза и премедикации [16].

В последнее десятилетие для исследования головного мозга новорожденных все чаще используют МРТ [14, 34].

Использование МРТ в диагностике поражений вещества головного мозга явилось важным прорывом в медицине, позволившим получить практически полную, однозначную визуальную картину состояния мозга на различных этапах его развития [7]. Современная структурная МРТ с применением тонких срезов дает возможность выявить минимальные анатомические изменения серого и белого вещества. Функциональные методы МРТ помогают визуализировать тонкие процессы работы центральной нервной системы. У детей раннего возраста с помощью МРТ проводят точную оценку процессов миелинизации и зрелости нервной системы. Все эти возможности МРТ имеют важное значение для диагностики врожденных и приобретенных (как правило, постгипоксических) изменений головного мозга [35, 36].

МРТ является сложной методикой нейровизуализации, обладающей высокой чувствительностью, что позволяет хорошо дифференцировать структуры головного мозга [16, 37].

МРТ основана на явлении ядерного магнитного резонанса. Суть этого явления сводится в основном к следующему: ядра химических элементов в твердом, жидком или газообразном веществе можно представить как быстро вращающиеся вокруг своей оси магниты. Если эти ядра-магниты поместить во внешнее магнитное поле, то оси вращения начнут прецессировать (вращаться вокруг направления силовой линии внешнего магнитного поля), причем скорость прецессии зависит от величины напряженности магнитного поля. Если при этом исследуемый образец облучить радиоволной, то при равенстве частоты радиоволны и частоты прецессии наступит резонансное поглощение энергии радиоволны «замагниченными» ядрами. После прекращения облучения образца ядра атомов будут переходить в первоначальное состояние (релаксировать), при этом энергия, накопленная при облучении, будет высвобождаться в виде электромагнитных колебаний, которые можно зарегистрировать с помощью специальной аппаратуры.

В медицинских томографах по ряду причин используется регистрация ЯМР на протонах – ядрах атомов водорода, входящих в состав молекулы воды. Используемый в МРТ метод чрезвычайно чувствителен даже к незначительным изменениям концентрации водорода.

Современные томографы позволяют методом сканирования получить томограммы в произвольно ориентированной плоскости без изменения положения пациента. При этом в МРТ-исследовании используются аналогичные КТ-принципы пространственного кодирования информации и обработки данных. Чем выше напряженность магнитного поля томографа, тем тоньше срезы можно сделать, тем точнее будет исследование, тем вернее будет результат. Большинство клинических магнитно-резонансных томографов содержат 0,5–1,5 Т магниты и лишь немногие – 3 Т. Более сильное магнитное поле может обеспечить дальнейшее детальное обследование. Время сканирования зависит от поставленных задач и параметров магнитно-резонансного томографа и составляет в среднем от 15 мин (для МРТ головы) до 60 мин. В конечном итоге на экране дисплея появляются изображения срезов исследуемой ткани, например ткани мозга.

Диагностический потенциал МРТ можно повысить путем предварительного введения контрастных веществ. В качестве вводимого в кровяное русло контрастного вещества обычно применяют элемент из группы редкоземельных металлов – гадолиний, обладающий свойствами парамагнетика.

При поражениях ЦНС с изменением физических и химических характеристик тканей головного мозга МРТ – более точный и специфичный метод исследования, чем РКТ [28].

Немаловажным преимуществом МРТ перед РКТ является возможность получения изображения в любой проекции: аксиальной, фронтальной, сагиттальной. Преимущество МРТ по сравнению с РКТ наиболее очевидно при исследовании тех отделов нервной системы, изображение которых нельзя получить с помощью РКТ из-за перекрытия исследуемой мозговой ткани прилежащими костными структурами (в частности, задней черепной ямкой). Кроме того, при МРТ можно различать недоступные РКТ изменения плотности ткани мозга, белое и серое вещество, выявлять поражение ткани мозга при демиелинизирующих заболеваниях нервной системы. МРТ позволяет исследовать ликворные пространства в динамике, изучать метаболические процессы в тканях мозга с помощью диффузионных и перфузионных изображений, а также МР-спектроскопии [10, 38].

Наибольшую ценность МРТ головного мозга приобретает в первый год жизни, так как именно в этот период развития ребенка аномалии (пороки) развития головного мозга без данных нейровизуализации могут трактоваться как внутриутробный менингоэнцефалит, гипоксическое или геморрагическое поражение нервной системы, объемные образования.

При проведении МРТ детям до 1 года используются общепринятые импульсные последовательности (спиновое эхо, градиентное эхо и инверсия-восстановление) и быстрые импульсные последовательности для проведения МР-миелографии (быстрое спиновое эхо, турбоспиновое эхо, последовательности для получения T2-взвешенных изображений с подавлением свободной жидкости и жировой ткани). Применение быстрых импульсных последовательностей позволяет сократить время исследования. Время релаксации тканей головного и спинного мозга у новорожденных и детей до 1 года больше, чем у детей старшего возраста или у взрослых. Поэтому для достижения оптимального тканевого контраста требуется увеличение времени релаксации и времени эхо, а для последовательностей типа быстрого спинного эхо и турбоспинного эхо – увеличение размерности серии эхо-сигналов, собираемых за одно возбуждение (турбофактор, или фактор ускорения) [16, 38].

Заключение. Приоритетность различных методов нейровизуализации в диагностике структурных изменений головного мозга у детей определяется как клиническими показаниями для проведения исследования, так и разрешающими возможностями методов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Барашнев, Ю. И. Перинатальная неврология / Ю. И. Барашнев. – 2-е изд. – М. : Триада-Х, 2005. – 672 с.
2. Смирнова, Т. А. Нейросонография в диагностике церебральных поражений у детей с врожденной вирусной инфекцией / Т. А. Смирнова, М. Г. Храмушина // *Sonoace Int.* – 2002. – № 10. – С. 52–56.
3. Особенности заболеваемости и физического развития детей раннего возраста с перинатальными поражениями ЦНС в зависимости от уровня нервно-психического развития / О. М. Филькина [и др.] // *Паллиатив. медицина и реабилитация.* – 2010. – № 3. – С. 19–22.
4. Вельтищев, Ю. Е. Состояние здоровья детей и общая стратегия профилактики болезней : лекция для врачей : прил. к журн. «Российский вестник перинатологии и педиатрии» / Ю. Е. Вельтищев. – М., 1994. – 67 с.
5. Шабалов, Н. П. Неонатология : в 2 т. / Н. П. Шабалов. – 4-е изд., испр. и доп. – М. : МЕДпресс-информ, 2006. – Т. 1. – 608 с.
6. Нейровизуализация нарушений органогенеза головного мозга / А. К. Ахметбаева [и др.] // *Наука и здравоохранение.* – 2012. – № 5. – С. 73–76.
7. Белов, С. А. Магнитно-резонансная томография головного мозга детей в возрасте от периода новорожденности до 15 лет / С. А. Белов, В. И. Шумский, Т. А. Ахадов // *Альманах клин. медицины.* – 1999. – № 2. – С. 271–280.
8. Жукова, Л. И. Эхографическая картина воспалительных заболеваний головного мозга и их последствий у грудных детей / Л. И. Жукова, О. С. Зуева, Т. М. Рябов // *Охрана материнства и детства.* – 2013. – № 1 (21). – С. 59–63.
9. Дворяковский, И. В. Ультразвуковая анатомия здорового ребенка / И. В. Дворяковский. – М. : Фирма СТРОМ, 2009. – 384 с.
10. Лучевая диагностика в педиатрии / Национальный проект «Здоровье» ; ред.: А. Ю. Васильев, С. К. Терновой. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 368 с. – (Национальные руководства по лучевой диагностике и терапии).
11. Михайлов, М. К. Роль и место лучевой диагностики в современных условиях / М. К. Михайлов // *Практ. медицина.* – 2010. – № 2. – С. 15–19.
12. Терновой, С. К. Современная компьютерная томография в клинической медицине / С. К. Терновой, И. Ю. Насникова, С. П. Морозов // *Кремлев. медицина. Клин. вестн.* – 2008. – № 2. – С. 9–13.
13. Neonatal MRI to predict neurodevelopmental outcomes in preterm infants / L. J. Woodward [et al.] // *The New England J. of Med.* – 2006. – Vol. 355. – P. 685–694.

14. Клещенко, Е. И. Использование диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии для выявления гипоксически-ишемических поражений головного мозга у новорожденных / Е. И. Клещенко, Е. В. Шимченко, К. Ф. Голосеев // Педиатр. фармакология. – 2014. – Т. 11, № 1. – С. 69–73.
15. Ватолин, К. В. Ультразвуковая диагностика заболеваний головного мозга. Детская ультразвуковая диагностика / К. В. Ватолин ; под общ. ред. М. И. Пыкова, К. В. Ватолина. – М. : Видар, 2001. – 680 с.
16. Особенности применения методов лучевой диагностики в педиатрической практике / Г. Е. Труфанов [и др.] // Вестн. совр. клин. медицины. – 2013. – Т. 6, вып. 6. – С. 48–54.
17. Зубарева, Е. А. Нейросонография у детей раннего возраста / Е. А. Зубарева, Е. А. Улезко. – Минск : Парадокс, 2004. – 192 с.
18. Улезко, Е. А. Энцефалопатия новорожденных и родовая черепно-мозговая травма: клинико-нейрофизиологические исследования, дифференциальная диагностика, патоморфология, лечение / Е. А. Улезко, Г. Г. Шанько, М. К. Недзьведь. – Минск : Харвест, 2009. – 320 с.
19. Гринхальх, Т. Основы доказательной медицины : пер. с англ. / Т. Гринхальх. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 240 с.
20. Лютая, Е. Д. Лучевая диагностика в зеркале доказательной медицины / Е. Д. Лютая // Вестн. Волгоград. гос. мед. ун-та. – 2006. – № 4. – С. 20–26.
21. Боконбаева, С. Дж. Нейросонография недоношенных новорожденных детей с низкой массой тела при рождении / С. Дж. Боконбаева, Н. В. Вычигжанина // Вестн. Кыргыз.-рос. славян. ун-та. – 2011. – Т. 11, № 3. – С. 87–91.
22. Пальчик, А. Б. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных / А. Б. Пальчик, Н. П. Шабалов. – СПб. : Питер, 2000. – 224 с.
23. Rennie, J. M. Neonatal cerebral ultrasound / J. M. Rennie. – UK : Cambridge University Press, 2000. – 245 p.
24. Ультрасонография в нейроредиапии. Новые возможности и перспективы : ультрасоногр. атлас / А. С. Иова [и др.]. – СПб. : Петровский и К^о, 1997. – 160 с.
25. Кривцова, Л. А. Методы нейровизуализации в построении прогноза исходов церебральной ишемии у детей первого года жизни / Л. А. Кривцова, В. В. Бельский // Вестн. новых мед. технологий. – 2013. – Т. 20, № 2. – С. 423–427.
26. Радченко, Е. В. Влияние внутриутробной гипоксии и внутриутробных инфекций на результаты нейросонографии и электроэнцефалографии у детей / Е. В. Радченко // Междунар. журн. эксперим. образования. – 2015. – № 5. – С. 39–40.
27. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике / под ред. В. В. Митькова, М. В. Медведева. – М. : Видар, 1997. – Т. 3. – 320 с.
28. Нейрорентгенология детского возраста / А. Н. Коновалов [и др.]. – М. : АНТИДОР, 2001. – 436 с.
29. White matter injury in the premature infant: a comparison between serial cranial sonographic and MR findings at term / T. E. Inder [et al.] // Am. J. Neuroradiol. – 2003. – Vol. 24, N 5. – P. 805–809.
30. Comparison of findings on cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in preterm infants / E. F. Maalouf [et al.] // Pediatrics. – 2001. – Vol. 107, N 4. – P. 719–727.
31. Терновой, С. К. Развитие компьютерной томографии и прогресс лучевой диагностики / С. К. Терновой, В. Е. Сеницын // Терапевт. архив. – 2006. – № 1. – С. 10–13.
32. Хоружик, С. А. Показатели качества компьютерно-томографических изображений / С. А. Хоружик, И. Г. Тарутин, А. Н. Михайлов // Актуальные вопросы лучевой визуализации : сб. науч. работ, посвящ. 70-летию акад. Нац. акад. наук Беларуси А. Н. Михайлова и 55-летию каф. лучевой диагностики Белорус. мед. акад. последиплом. образования. – Минск : БелМАПО, 2006. – С. 28–33.
33. Pediatric CT: strategies to lower radiation dose / C. Zacharias [et al.] // Am. J. Roentgenol. – 2013. – Vol. 200, N 5. – P. 950–956.
34. Шестова, Е. П. Ценность рутинных МРТ-исследований головного мозга при двигательных нарушениях у детей раннего возраста (отсутствие доказательств – это еще не доказательство отсутствия) / Е. П. Шестова, С. К. Евтушенко, Е. А. Савченко // Междунар. неврол. журн. – 2014. – № 3 (65). – С. 176–177.
35. Аникин, А. В. Современные возможности магнитно-резонансной томографии в педиатрии / А. В. Аникин, М. З. Каркашадзе, Г. В. Кузнецова // Вопр. диагностики в педиатрии. – 2009. – № 2. – С. 50–54.
36. Возможности оценки моторных и сенсорных проводящих путей головного мозга с помощью диффузионно-тензорной трактографии у детей с детским церебральным параличом / А. М. Мамедьяров [и др.] // Вестн. Рос. акад. мед. наук. – 2014. – № 9–10. – С. 70–76.
37. Шехтман, А. Г. Применение метода магнитно-резонансной томографии в клинической оценке структур головного мозга в норме и при опухолевой патологии / А. Г. Шехтман, О. Я. Малыгина // Мед. альманах. – 2014. – № 5 (35). – С. 174–178.
38. Ринкк, П. А. Магнитный резонанс в медицине. Основной учебник Европейского форума по магнитному резонансу / П. А. Ринкк ; пер. с англ. В. Е. Сеницына, Д. В. Устюжанина ; под ред. В. Е. Сеницына. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 256 с.

References

1. Barashnev Iu. I. *Perinatal neurology*. Moscow, Triada-Kh Publ., 2005. 672 p. (in Russian).
2. Smirnova T. A., Khrameshina M. G. Neurosonography in the diagnosis of cerebral lesions in children with congenital viral infection. *Sonoace International*, 2002, no. 10, pp. 52–56 (in Russian).
3. Fil'kina O. M., Pykhtina L. A., Kocherova O. Iu., Shanina T. G., Kurbanova E. N. Peculiarities of morbidity and physical development of young children with perinatal lesions of the central nervous system depending on the level of neuropsy-

chological development. *Palliativnaia meditsina i reabilitatsiia* [Palliative Medicine and Rehabilitation], 2010, no. 3, pp. 19–22 (in Russian).

4. Vel'tishchev Iu. E. *The state of children's health and the overall strategy of disease prevention*. Moscow, 1994. 67 p. (in Russian).

5. Shabalov N. P. *Neonatology*: in 2 volumes, 4 th ed., revised and amended. Moscow, MEDpress-inform Publ., 2006, vol. 1. 608 p. (in Russian).

6. Ahmetbaeva A. K., Janchenko A. A., Rahimbekov A. V., Timofeeva K. V. Neurovisualization of disorders of brain organogenesis. *Nauka i zdavoohranenie* [Science and Public Health], 2012, no. 5, pp. 73–76 (in Russian).

7. Belov S. A., Shumskij V. I., Ahadov T. A. Magnetic resonance imaging of the brain of children aged from the neonatal period to 15 years. *Al'manah klinicheskoy mediciny* [Almanac of Clinical Medicine], 1999, no. 2, pp. 271–280 (in Russian).

8. Zhukova L. I., Zueva O. S., Rjabov T. M. Echographic picture of inflammatory diseases of the brain and their effects in infants. *Ohrana materinstva i detstva* [Protection of Motherhood and Childhood], 2013, no. 1, pp. 59–63 (in Russian).

9. Dvorjakovskij I. V. *Ultrasonic anatomy of a healthy child*. Moscow, Firma STROM Publ., 2009. 384 p. (in Russian).

10. *Radiation diagnosis in pediatrics*, series: National guidelines on radiation diagnosis and therapy, National project «Health», ed.: A. Ju. Vasil'ev, S. K. Ternovoi. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2010. 368 p. (in Russian).

11. Mikhaylov M. K. The role and place of radiation diagnosis in modern conditions. *Prakticheskaya meditsina* [Practical Medicine], 2010, no. 2, pp. 15–19 (in Russian).

12. Ternovoi S. K., Nasnikova I. Iu., Morozov S. P. Modern computed tomography in clinical medicine. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskii vestnik* [The Kremlin Medicine. Clinical Bulletin], 2008, no. 2, pp. 9–13 (in Russian).

13. Woodward L. J., Anderson P. J., Austin N. C., Howard K., Inder T. E. Neonatal MRI to predict neurodevelopmental outcomes in preterm infants. *The New England Journal of Medicine*, 2006, vol. 355, no. 7, pp. 685–694. DOI: 10.1056/NEJMoa053792

14. Kleshchenko E. I., Shimchenko E. V., Goloseev K. F. The use of diffusion-weighted magnetic resonance imaging to detect hypoxic-ischemic brain lesions in newborns. *Pediatricheskaya farmakologiya* [Pediatric Pharmacology], 2014, vol. 11, no. 1, pp. 69–73 (in Russian).

15. *Ultrasound diagnosis of brain diseases. Children's ultrasound diagnosis*, under the general editorship of M. I. Pykov, K. V. Vatolin. Moscow, Vidar Publ., 2001. p. 680 (in Russian).

16. Trufanov G. E., Fokin V. A., Ivanov D. O., Riazanov V. V., Ipatov V. V., Skvortsova M. Iu., Nesterov D. V., Sadykova G. K., Mikhailovskaya E. M. Peculiarities of the application of methods of radiation diagnosis in pediatric practice. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny* [Bulletin of Modern Clinical Medicine], 2013, vol. 6, no. 6, pp. 48–54 (in Russian).

17. Zubareva E. A., Ulezko E. A. *Neurosonography in infants*. Minsk, Paradoks Publ., 2004. 192 p. (in Russian).

18. Ulezko E. A., Shan'ko G. G., Nedz'ved' M. K. *Encephalopathy of newborns and birth craniocerebral trauma: clinical and neurophysiological studies, differential diagnostics, pathomorphology, treatment*. Minsk, Kharvest Publ., 2009. 320 p. (in Russian).

19. Grinhal'h T. *Fundamentals of Evidence-Based Medicine*: translation from english. Moscow, GEOTAR-MED Publ., 2004. 240 p. (in Russian).

20. Ljutaja E. D. Radiodiagnosis in the mirror of evidence-based medicine. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Bulletin of the Volgograd State Medical University], 2006, no. 4, pp. 20–26 (in Russian).

21. Bokonbaeva S. J., Vychigzhanina N. V. Neurosonography of preterm infants with low birth weight. *Vestnik Kyrgyzsko-rossijskogo slavjanskogo universiteta* [Bulletin of the Kyrgyz-Russian Slavic University], 2011, vol. 11, no. 3, pp. 87–91 (in Russian).

22. Pal'chik A. B., Shabalov N. P. *Hypoxic-ischemic encephalopathy of newborns: a guide for physicians*. St. Petersburg, Piter Publ., 2000. 224 p. (in Russian).

23. Rennie J. M. *Neonatal cerebral ultrasound*. UK, Cambridge University Press, 2000. 245 p.

24. Iova A. S., Garmashov Iu. A., Andrushchenko N. V., Pautnitskaia T. S. *Ultrasonography in neuropediatrics. New possibilities and perspectives: ultrasonographic atlas*. St. Petersburg, Petrovskii i K^o Publ., 1997. 160 p. (in Russian).

25. Krivtsova L. A., Bel'skii V. V. Methods of neuroimaging in the construction of the prognosis of outcomes of cerebral ischemia in children of the first year of life. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii* [Bulletin of new medical technologies], 2013, vol. 20, no. 2, pp. 423–427 (in Russian).

26. Radchenko E. V. Influence of intrauterine hypoxia and intrauterine infections on the results of neurosonography and electroencephalography in children. *Mezhdunarodnyi zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniia* [International Journal of Experimental Education], 2015, no. 5, pp. 39–40 (in Russian).

27. *Clinical guideline for ultrasound diagnostics*, ed.: B. V. Mit'kov, M. V. Medvedev. Moscow, Vidar Publ., 1997, vol. 3. 320 p. (in Russian).

28. Konovalov A. N., Kornienko V. N., Ozerova V. I., Pronin I. N. *Neuroradiology of childhood*. Moscow, ANTIDOR Publ., 2001. 436 p. (in Russian).

29. Inder T. E., Anderson N. J., Spencer C., Wells S., Volpe J. J. White matter injury in the premature infant: a comparison between serial cranial sonographic and MR findings at term. *American Journal of Neuroradiology*, 2003, vol. 24, no. 5, pp. 805–809.

30. Maalouf E. F., Duggan P. J., Counsell S. J., Rutherford M. A., Cowan F., Azzopardi D., Edwards A. D. Comparison of findings on cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in preterm infants. *Pediatrics*, 2001, vol. 107, no. 4, pp. 719–727.

31. Ternovoj S. K., Sinicyn V. E. The development of computed tomography and the progress of radiodiagnosis. *Terapevticheskij arhiv* [Therapeutic Archive], 2006, no. 1, pp. 10–13 (in Russian).

32. Horuzhik S. A., Tarutin I. G., Mihajlov A. N. Quality indicators of computer tomography images. *Aktual'nye voprosy luchevoj vizualizacii : sbornik nauchnyh rabot, posvjashhennyj 70-letiju akademika Nacional'noj akademii nauk Belarusi A. N. Mihajlova i 55-letiju kafedry luchevoj diagnostiki Belorusskoj medicinskoj akademii posle diplomnogo obrazovanija* [Actual problems of radiation visualization: a collection of scientific works dedicated to the 70th anniversary of the academician of the National Academy of Sciences of Belarus A. N. Mikhailova and the 55th anniversary of the Department of Radiation Diagnostics of the Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education]. Minsk, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, 2006, pp. 28–33 (in Russian).

33. Zacharias C., Alessio A. M., Otto R. K., Iyer R. S., Philips G. S., Swanson J. O., Thapa M. M. Pediatric CT: strategies to lower radiation dose. *American Journal of Roentgenology*, 2013, vol. 200, no. 5, pp. 950–956. DOI: 10.2214/AJR.12.9026

34. Shestova E. P., Evtushenko S. K., Savchenko E. A. The value of routine brain MRI examinations for motor disabilities in young children (lack of evidence is not proof of absence). *Mezhdunarodnyj nevrologicheskij zhurnal* [International Neurological Journal], 2014, no. 3, pp. 176–177 (in Russian).

35. Anikin A. V., Karkashadze M. Z., Kuznetsova G. V. Modern possibilities of magnetic resonance imaging in pediatrics. *Voprosy diagnostiki v pediatrii* [Problems of Diagnosis in Pediatrics], 2009, no. 2, pp. 50–54 (in Russian).

36. Mamed'jarov A. A., Namazova-Baranova L. S., Ermolina Ju. V., Anikin A. V., Maslova O. A., Karkashadze M. Z., Klochkova O. A. Possibilities of evaluation of motor and sensory conductive pathways of the brain with the help of diffusion-tensor tractography in children with cerebral palsy. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk* [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences], 2014, no. 9–10, pp. 70–76 (in Russian).

37. Shehtman A. G., Malygina O. Ja. The use of the method of magnetic resonance imaging in the clinical evaluation of brain structures in norm and in tumor pathology. *Medicinskij al'manah* [Medical Almanac], 2014, no. 5, pp. 174–178 (in Russian).

38. Rink P. A. *Magnetic resonance in medicine. The main textbook of the European Forum on Magnetic Resonance*, translation from English by V. E. Sinitsyna, D. V. Ustyuzhanin, edited by V. E. Sinitsyn. Moscow, GEOTAR-MED Publ., 2003. 256 p. (in Russian).

Информация об авторах

Марацкая Наталья Викторовна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя».

(ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: maratskaya@gmail.com.

Девялтовская Маргарита Георгиевна – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: margo-medical@tut.by.

Бучель Юрий Юрьевич – заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: buchelyu@gmail.com.

Улезко Елена Альбертовна – д-р мед. наук, заместитель директора. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ulezco@tut.by.

Information about the authors

Natalia V. Maratskaya – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: maratskaya@gmail.com.

Margarita G. Devyaltovskaya – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: margo-medical@tut.by.

Yuri Yu. Buchel – Head of the Department. Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: buchelyu@gmail.com.

Elena A. Ulezko – D. Sc. (Med.), Deputy Director. Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ulezco@tut.by.