

# ВЕСЦІ

## НАЦЫЯНАЛЬнай

### АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

---

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2019. Том 16. № 2

---

# ИЗВЕСТИЯ

## НАЦИОНАЛЬНОЙ

### АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

---

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2019. Том 16. № 2

---

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:**

- 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** – Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, 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** – Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Беларусь
- А. Ф. Смянович** – Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Беларусь
- А. Н. Стожаров** – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь
- Л. П. Титов** – Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, 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. Клюшник** – 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. 2019. Том 16, № 2

*Выходит на русском, белорусском и английском языках*

---

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

Подписано в печать 20.05.2019. Выход в свет 29.05.2019. Формат 60×84<sup>1/8</sup>. Бумага офсетная.  
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 44 экз. Заказ 113.  
Цена номера: индивидуальная подписка – 11,74 руб., ведомственная подписка – 28,19 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

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

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,  
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук, 2019

# PROCEEDINGS

## OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

---

MEDICAL SERIES. 2019. Vol. 16. No. 2

---

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:**

**Nikolai S. Serdyuchenko** (*Associate Editor-in-Chief*) – Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**Valentina G. Kolosovskaya** (*Managing Editor*)

**Olga V. Aleinikova** – Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

**Mikhail A. Herasimenka** – Republican Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics, Minsk, Belarus

**Sergei L. Kabak** – Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

**Natalia P. Mitkovskaya** – Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

**Aleksandr G. Mrochek** – Republican Scientific and Practical Center “Cardiology”, Minsk, Belarus

**Dmitry L. Pinevich** – First Deputy Minister of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

**Oleg O. Rummo** – Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Belarus

**Arnold F. Smeyanovich** – Republican Research and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Belarus

**Aleksandr N. Stozharov** – Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

**Leonid P. Titov** – Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

**Frantisek 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. 2019. Vol. 16, No. 2.

*Printed in Russian, Belarusian and English languages*

---

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

It is sent of the press 20.05.2019. Appearance 29.05.2019. Format 60×84 <sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Offset paper. The press digital.  
Printed pages 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 44 copies. Order 113.  
Number price: individual subscription – 11,74 byn., departmental subscription – 28,19 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, 2019

## ЗМЕСТ

### КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Емельянчик С. В., Карнюшко О. А., Зиматкин С. М. Экспрессия белка c-fos в нейронах коры мозжечка крыс при холестазах.....	135
Антипова О. А., Жаворонок И. П., Павлють Т. О., Пехтерева Е. И., Мелик-Касумов Т. Б., Кодаленкова С. А., Михальчук А. Л., [Кисель М. А.], Молчанова А. Ю. Хроническая интоксикация липосомальными формами амидов жирных кислот в эксперименте .....	142
Домбаян С. Х., Панова И. В., Летифов Г. М. Нейронспецифическая енолаза крови у детей с <i>Helicobacter pylori</i> -ассоциированным хроническим гастродуоденитом .....	151
Королько А. С., Сушевич В. В., Евко Я. И., Кезля О. П. Популяционная характеристика пациентов с кокартрозом .....	156
Астроўскі А. А., Максімчык Ю. З., Гурыновіч В. А., Астроўская А. Б., Майсяёнак А. Г. Змяненне гісталагічнай структуры селязёнкі пацукоў пад уздзеяннем прэднізалона і яго камбінацыі з вітамінам D .....	166
Пырочкин А. В., Пристром А. М., Пилотович В. С., Горецкая Д. Н., Юрага Т. М., Борисенко Т. Д., Воробьева Е. А., Соловей О. М., Черноглаз П. Ф., Веселов В. В., Лушников И. Е., Пискунов С. Е. Диагностика контраст-индуцированной нефропатии после чрескожного коронарного вмешательства .....	175
Разводовский Ю. Е., Смирнов В. Ю., Максимович Н. Е., Семененя И. Н. Пул свободных аминокислот плазмы крови у крыс при субтотальной ишемии головного мозга в условиях блокады синтеза монооксида азота метиловым эфиром N-нитро-L-аргинина (L-NAME).....	185
Руденко Е. В., Руденко Э. В., Самоховец О. Ю., Кобец Е. В., Морозик П. М. Ассоциация полиморфных вариантов гена рецептора витамина D с показателями минеральной плотности костной ткани у женщин в менопаузе.....	192
Столярова Е. А., Мигаль Н. В., Белевцев М. В., Мовчан Л. В., Быданов О. И., Попов А. М., Фечина Л. Г., Алейникова О. В. Влияние показателей минимальной остаточной болезни на риск развития рецидива у пациентов с острым лимфобластным лейкозом .....	202
Чуешова Н. В., Висмонт Ф. И., Чешик И. А. Влияние электромагнитного излучения от мобильного телефона (1745 МГц) на состояние репродуктивной системы крыс-самцов в период их постнатального развития....	216
Ясючэня Р. Н., Кондрашова С. Б., Лукашенко Т. М. Функциональное состояние сердца, перекисное окисление белков и активность антиоксидантных ферментов в крови половозрелых крыс при введении в рацион пищевых добавок .....	226
Дуж Е. В., Гончаров А. Е. Оценка <i>in vitro</i> иммуномодулирующих свойств биологически активных веществ и лекарственных средств .....	234

### АГЛЯДЫ

Семененя И. Н., Шляхтун А. Г., Радута Е. Ф. Роль рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом, в контроле алкогольной зависимости и лечении сопутствующих заболеваний печени.....	244
---	-----

**CONTENTS****CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE**

<b>Emelyanchik S. V., Karniushko O. A., Zimatkin S. M.</b> Expression of protein c-fos in cerebellum neurons of rats at cholestasis .....	135
<b>Antipova O. A., Zhavoronok I. P., Pavlut T. O., Pehtereva E. I., Melik-Kasumov T. B., Kodalenkova S. A., Mihal'chuk A. L., Kisel M. A., Molchanova A. Yu.</b> Chronic intoxication with liposomal fatty acid amides in the experiment .....	142
<b>Dombayan S. Kh., Panova I. V., Letifov G. M.</b> Neuron-specific blood enolase in children with <i>Helicobacter pylori</i> -associated chronic gastroduodenitis .....	151
<b>Korolko A. S., Suschevich V. V., Evko Ya. I., Kezlya O. P.</b> Population characteristics of patients with coxarthrosis .....	156
<b>Astrowski A. A., Maksimchyk Yu. Z., Gurinovich V. A., Astrowskaja A. B., Moiseenok A. G.</b> Histological changes in the spleen of rats under the influence of prednisolone and its combination with vitamin D .....	166
<b>Pyrochkin A. V., Prystrom A. M., Pilotovich V. S., Horetskaya D. N., Yuraga T. M., Borisenko T. D., Varabyova E. A., Solovey O. M., Chernoglaz P. F., Veselov V. V., Lushnikova I. E., Piskunov S. E.</b> Diagnostics of contrastinduated nephropathy after percutaneous coronary intervention .....	175
<b>Razvodovsky Y. E., Smirnov V. Y., Maksimovich N. Ye., Semeneya I. N.</b> Pool of free amino acids in the blood plasma of rats undergoing subtotal cerebral ischemia after L-name administration .....	185
<b>Rudenska A. V., Rudenska E. V., Samokhovec V. Yu., Kobets K. V., Marozik P. M.</b> Association of vitamin D receptor gene polymorphism with a bone mineral density level in postmenopausal women .....	192
<b>Stolyarova E. A., Migal N. V., Belevtsev M. V., Movchan L. V., Budanov O. I., Popov A. M., Fechina L. G., Aleinikova O. V.</b> Influence of value of minimal residual disease at risk of developing recurrence of relapse in patients with acute lymphoblastic leukemia .....	202
<b>Chueshova N. V., Vismont F. I., Cheszyk I. A.</b> Effect of electromagnetic radiation from a mobile phone (1745 MHz) on the condition of the reproductive system of male rats during their postnatal development .....	216
<b>Yasyuchenya R. N., Kondrashova S. B., Lukashenko T. M.</b> Functional state of the heart, peroxidation of proteins and the activity of antioxidant enzymes in the blood of sexually mature rats when introducing food supplements .....	226
<b>Duzh A. V., Hancharou A. Y.</b> Evaluation of <i>in vitro</i> immunomodulatory properties of biologically active substances and drugs .....	234

**REVIEWS**

<b>Semeneya I. N., Shlyahun A. H., Raduta H. F.</b> Role of peroxisome proliferator-activated receptors in the control of alcohol dependence and concomitant liver pathology .....	244
--	-----

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

УДК 612.82:616.367-008.811.5/.6)-092.9  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-135-141>

Поступила в редакцию 04.05.2018  
Received 04.05.2018

**С. В. Емельянчик<sup>1</sup>, О. А. Карнюшко<sup>2</sup>, С. М. Зиматкин<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Республика Беларусь  
<sup>2</sup>Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

**ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА C-FOS В НЕЙРОНАХ КОРЫ МОЗЖЕЧКА КРЫС  
ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ**

**Аннотация.** Холестаз (нарушение оттока желчи из печени в двенадцатиперстную кишку) является частым осложнением желчекаменной болезни и другой патологии гепатобилиарной системы. При этом нарушаются все виды обмена веществ и поражаются все органы и системы организма, включая нервную.

Цель исследования – установить изменения иммунореактивности белка c-fos в нейронах мозжечка крыс в различные сроки после моделирования подпеченочного холестаза.

В работе использован материал от 60 беспородных белых крыс-самцов массой 200–250 г. Опытным животным проводили перевязку общего желчного протока, контрольным – ложную операцию с сохранением физиологического тока желчи в двенадцатиперстную кишку на протяжении всего эксперимента.

Установлено, что подпеченочный холестаз у крыс на 2–20-е сутки после перевязки общего желчного протока сопровождается возрастанием в коре мозжечка числа нейронов с повышенной c-fos-иммунореактивностью (пик наблюдается на 10-е сутки опыта). У выживших животных после устранения холестаза в отдаленные сроки опыта (45–90-е сутки) количество нейронов с повышенной c-fos-иммунореактивностью, а также экспрессия этого белка в нейронах нормализуются.

**Ключевые слова:** холестаз, мозжечок, клетки Пуркинье, c-fos, крысы

**Для цитирования:** Емельянчик, С. В. Экспрессия белка c-fos в нейронах коры мозжечка крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 135–141. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-135-141>

**S. V. Emelyanchik<sup>1</sup>, O. A. Karniushko<sup>2</sup>, S. M. Zimatkin<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus  
<sup>2</sup>Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

**EXPRESSION OF PROTEIN C-FOS IN CEREBELLUM NEURONS OF RATS AT CHOLESTASIS**

**Abstract.** Cholestasis (disturbance of the liver bile outflow into the duodenum) is a frequent complication of cholelithiasis and other pathologies of the hepatobiliary system. In this case, all metabolism types are disturbances and all body organs and systems, including the nervous system, are affected.

The objective of the study was to establish changes in the c-fos immunoreactivity in the cerebellum neurons of rats at different time after modeling subhepatic cholestasis.

In this work, we used a material of 60 white male rats 200–250 g in weight. In experimental animals, the ligation of the common bile duct was carried out, in control animals – a false operation while maintaining a physiological bile flow in the duodenum throughout the experiment.

Subhepatic cholestasis in rats is accompanied by an increase in the cortex cerebellum on the 2–20th days after the ligation of the common bile duct of the number of neurons with the increased c-fos-immunoreactivity, with the maximum one on the 10th day of the experiment. In surviving animals, after the removal of cholestasis in the long term (45–90 days), the number of neurons with the increased c-fos immunoreactivity, as well as the expression of this protein in neurons is normalized.

**Keywords:** cholestasis, cerebellum, Purkinje cells, c-fos, rats

**For citation:** Emelyanchik S. V., Karniushko O. A., Zimatkin S. M. Expression of protein *c-fos* in cerebellum neurons of rats at cholestasis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 135–141 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-135-141>

**Введение.** Холестаз (нарушение оттока желчи из печени в двенадцатиперстную кишку) является частым осложнением желчекаменной болезни и другой патологии гепатобилиарной системы. Он приводит к нарушениям переваривания и всасывания в кишечнике (особенно жиров) и накоплению компонентов желчи в крови (билирубин, холестерин, желчные кислоты). При этом нарушаются все виды обмена веществ и поражаются все органы и системы организма, включая нервную [1, 2]. У пациентов и животных с холестазом развиваются нервно-психические и поведенческие нарушения [3, 4]. В предыдущих исследованиях нами выявлены вполне закономерные глубокие при экспериментальном подпеченочном холестазе гистологические, гистохимические и ультраструктурные изменения в нейронах коры головного мозга, мозжечка и гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс, приводящие к их повреждению и гибели [1, 5–7]. Представляет большой интерес изучение при этом молекулярных нейромаркеров, которые могут быть связаны с выявленными морфофункциональными нарушениями. Среди них особое внимание привлекает белок *c-fos*, экспрессия которого отражает активацию гена *c-fos*, который относится к группе генов немедленного раннего ответа нейронов, которые транскрипционно регулируют гены, контролирующие выживание, пролиферацию и рост клеток [8, 9]. Выявление данного белка используют как иммуногистохимический маркер активации нейронов [10].

В предыдущих исследованиях установлено, что в ответственных за поддержание артериального давления нейронах ядра солитарного тракта среднего мозга крыс через 5 сут после перевязки общего желчного протока (ОЖП) иммунореактивность белка *c-fos* не менялась, а после 25 сут холестаза повышалась [11]. Через 21 сут после легирования ОЖП в головном мозге крыс линии Wistar установлено снижение иммунореактивности *c-fos* белка в ядре боковой перегородки и медиальном амигдаллярном ядре [4]. Кроме того, показано, что при одном холестазе нет отличий в экспрессии *c-fos*, и только при дополнительном стрессе (водный лабиринт Морриса) у крыс отмечается увеличение количества иммунопозитивных нейронов в гиппокампе и префронтальной коре головного мозга [12]. Таким образом, данные литературы по изучению экспрессии *c-fos* в нейронах мозга при холестазе отрывочны и противоречивы, а по мозжечку совсем отсутствуют.

Цель исследования – установить изменения иммунореактивности *c-fos* в нейронах мозжечка крыс в различные сроки после моделирования подпеченочного холестаза.

**Материалы и методы исследования.** В работе использован материал от 60 беспородных белых крыс-самцов массой 200–250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На проведение исследования получено разрешение этического комитета УО «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол № 1 от 11.01.2017).

Для моделирования холестаза животным осуществляли перевязку ОЖП на 3–5 мм ниже слияния долевых протоков двумя лигатурами с последующим пересечением между ними [13]. Животным контрольной группы проводили ложную операцию. Через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 сут в утренние часы (для синхронизации по времени) животных выводили из эксперимента путем декапитации, предварительно усыпив парами эфира. Для исследования брали стандартные кусочки полушарий мозжечка согласно стереотаксическому атласу мозга крысы [14], фиксировали их в цинк-этанол-формальдегиде при +4 °С (на ночь), а затем заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм готовили с помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Для стандартизации полученных результатов образцы коры от всех животных обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях.

Для иммуногистохимического выявления *c-fos* применяли первичные поликлональные кроличьи антитела *c-fos* фирмы Abcam (Великобритания, ab 209794) в разведении 1:1000 при +4 °С, экспозиция 20 ч, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80437).

Изучение иммуногистохимических препаратов, их микрофотографирование и цитофотометрию проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). Подсчет иммунопозитивных *c-fos* нейронов производили в каждом препарате в соответствующем слое коры в 10 полях зрения. Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный номер 31415926535897). В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна–Уитни для независимых выборок (Mann–Whitney *U*-test). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ( $p < 0,05$ ).

**Результаты исследования.** Результаты иммуногистохимического исследования показали, что *c-fos*-позитивные нейроны выявляются во всех слоях коры мозжечка. Ядра нейронов иммунонегативны. Цитоплазма этих нейронов заполнена мелкими коричневыми гранулами хромогена, демонстрирующими расположение исследуемого белка. Иногда окрашиваются начальные участки дендритов клеток Пуркинье. При этом *c-fos*-иммунореактивность разных нейронов значительно варьируется, однако преобладают клетки с умеренной *c-fos*-иммунореактивностью (рис. 1–4).

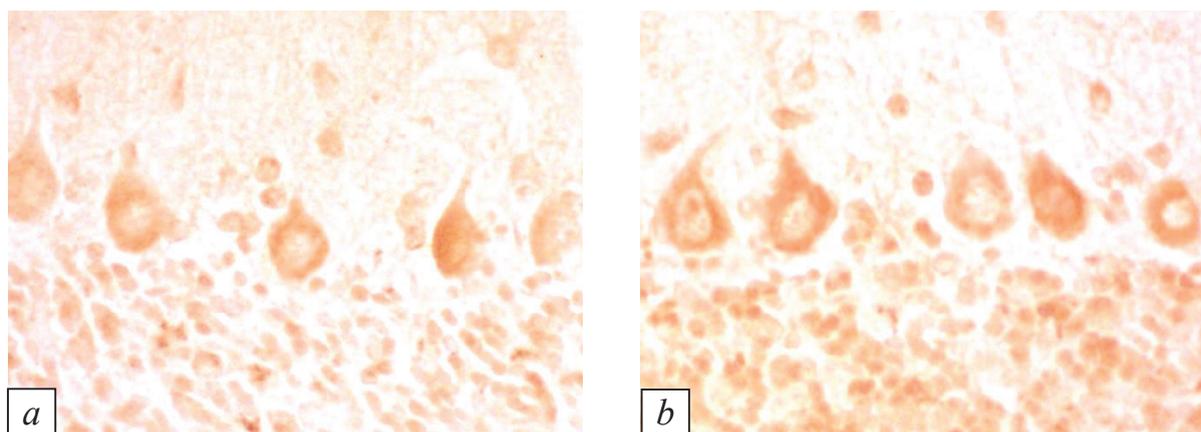


Рис. 1. Экспрессия *c-fos* в клетках Пуркинье коры мозжечка крыс: *a* – в контроле (через 2 сут после ложной операции), *b* – в опыте (после 2 сут холестаза). Цифровая микрофотография,  $\times 300$

Fig. 1. Expression of *c-fos* in Purkinje cells of the cerebellar cortex of rats: *a* – control (2 days after a false operation), *b* – experiment (after 2 days of cholestasis). Digital microphotography,  $\times 300$

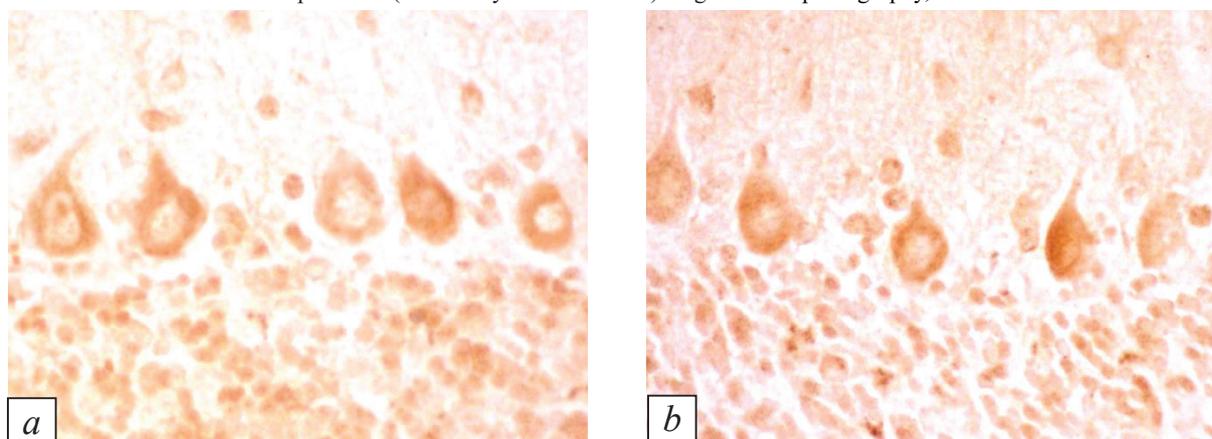


Рис. 2. Экспрессия *c-fos* в клетках Пуркинье коры мозжечка крыс: *a* – в контроле (через 5 сут после ложной операции), *b* – в опыте (после 5 сут холестаза). Цифровая микрофотография,  $\times 300$

Fig. 2. Expression of *c-fos* in Purkinje cells of the cerebellar cortex of rats: *a* – control (5 days after a false operation), *b* – experiment (after 5 days of cholestasis). Digital microphotography,  $\times 300$

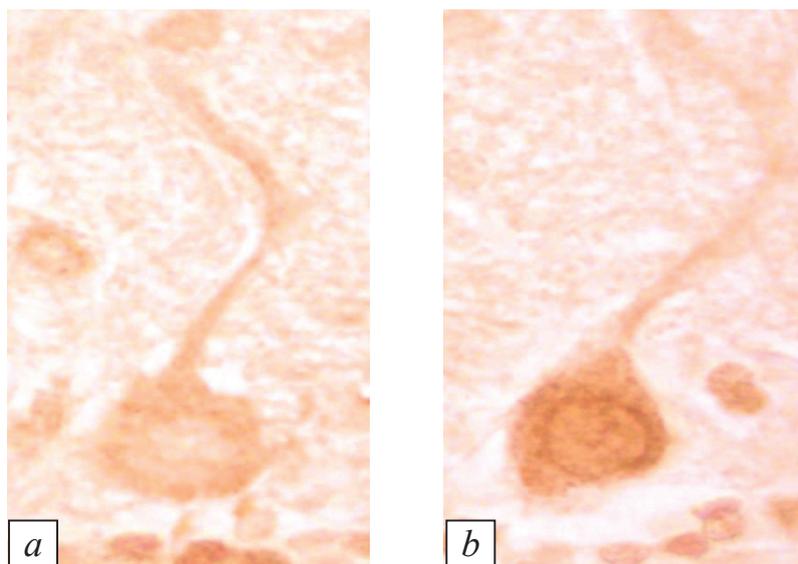


Рис. 3. Экспрессия *c-fos* в клетках Пуркинье коры мозжечка крыс: *a* – в контроле (через 20 сут после ложной операции), *b* – в опыте (после 20 сут холестаза). Цифровая микрофотография,  $\times 800$

Fig. 3. Expression of *c-fos* in Purkinje cells of the cerebellar cortex of rats: *a* – control (20 days after a false operation), *b* – experiment (after 20 days of cholestasis). Digital microphotography,  $\times 800$

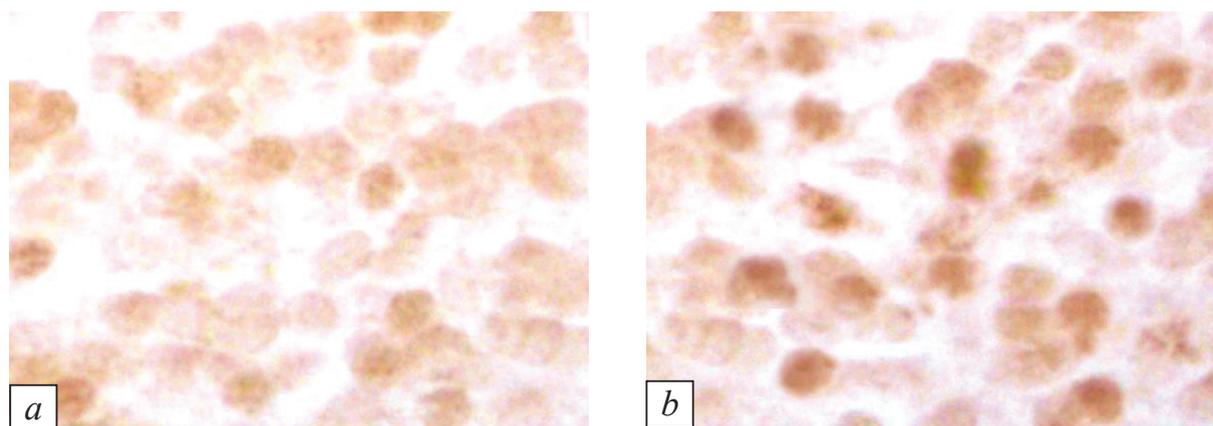


Рис. 4. Экспрессия *c-fos* в ядрах клеток-зерен коры мозжечка крыс: *a* – в контроле (через 2 сут после ложной операции), *b* – в опыте (после 2 сут холестаза). Цифровая микрофотография,  $\times 400$

Fig. 4. Expression of *c-fos* in the nuclei of the cell-grains of the cerebellar cortex of rats: *a* – control (2 days after a false operation), *b* – experiment (after 2 days of cholestasis). Digital microphotography,  $\times 400$

После 2 сут холестаза происходит увеличение экспрессии *c-fos* в цитоплазме клеток Пуркинье (табл. 1) на 13 % ( $p = 0,002$ ) и возрастание числа зернистых нейронов с высокой *c-fos*-иммунореактивностью (от 17,3 % в контроле до 24,4 % в опыте) (табл. 2, рис. 1).

После 5 сут холестаза экспрессия *c-fos* в клетках Пуркинье мозжечка увеличена на 16,6 % ( $p = 0,001$ ), а число зернистых нейронов с высокой *c-fos*-иммунореактивностью возрастает до 27 % (рис. 2, табл. 1, 2).

После 10 сут холестаза экспрессия *c-fos* в клетках Пуркинье мозжечка повышена на 20,5 % ( $p = 0,003$ ), а число зернистых нейронов с высокой *c-fos*-иммунореактивностью возрастает до 30 % (табл. 2).

После 20 сут холестаза экспрессия *c-fos* в клетках Пуркинье мозжечка повышена на 16 % ( $p = 0,002$ ), а число зернистых нейронов с высокой *c-fos*-иммунореактивностью составляет 25,5 % (рис. 3, табл. 2).

Через 45 и 90 сут после перевязки ОЖП, когда явления холестаза у выживших животных исчезают (в результате разрастания обходных желчевыводящих протоков), содержание c-fos в цитоплазме клеток Пуркинье мозжечка и число клеток с высокой c-fos-иммунореактивностью нормализуется (см. табл. 1, 2).

Таблица 1. Экспрессия c-fos в перикарионах клеток Пуркинье коры мозжечка крыс контрольной группы и в разные сроки подпеченочного холестаза ( $\times 10^3$ ) (Me  $\pm$  IQR)

Table 1. Expression of c-fos in the perikaryon of Purkinje cells of the cerebellar cortex of control rats and at different time of subhepatic cholestasis ( $\times 10^3$ ) (Me  $\pm$  IQR)

Сутки	Контроль (n = 30)	Опыт (n = 30)	p
2-е	274,0 $\pm$ 39,49	310,47 $\pm$ 79,52 *** <sup>†</sup>	0,002
5-е	279,20 $\pm$ 48,76	325,46 $\pm$ 125,13 *** <sup>†</sup>	0,001
10-е	288,31 $\pm$ 40,15	347,31 $\pm$ 92,28 *** <sup>†</sup>	0,003
20-е	280,13 $\pm$ 90,21	326,14 $\pm$ 102,38 *** <sup>†</sup>	0,002
45-е	270,97 $\pm$ 80,77	271,68 $\pm$ 58,50	0,194
90-е	242,94 $\pm$ 73,08	248,91 $\pm$ 33,23	0,351

Примечание. \*\*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с контролем; <sup>↓</sup> – статистически значимое снижение изучаемого параметра; <sup>†</sup> – статистически значимое увеличение изучаемого параметра.

Таблица 2. Экспрессия c-fos в клетках-зернах коры мозжечка крыс контрольной группы и в разные сроки подпеченочного холестаза, %

Table 2. Expression of c-fos in the cell-grains of the cerebellar cortex of control rats and at different time of subhepatic cholestasis, %

Сутки	Контроль (n = 30)	Опыт (n = 30)
2-е	17,3	24,4 <sup>†</sup>
5-е	17,2	26,9 <sup>†</sup>
10-е	17,2	30,3 <sup>†</sup>
20-е	17,2	25,5 <sup>†</sup>
45-е	17,2	18,8 <sup>†</sup>
90-е	16,9	16,8 <sup>↓</sup>

Примечание. <sup>†</sup> – увеличение изучаемого параметра; <sup>↓</sup> – уменьшение изучаемого параметра.

**Обсуждение.** Гетерогенность иммунореактивности c-fos в нейронах коры мозжечка в контроле может быть обусловлена разной функциональной активностью нейронов. Эта гетерогенность становится еще более выраженной после перевязки ОЖП (при моделировании холестаза), когда в отдельных нейронах иммунореактивность c-fos уменьшается, вплоть до полного исчезновения (вероятно, это погибающие нейроны), а в других – резко возрастает (активированные нейроны, возможно пытающиеся адаптироваться и выжить). Максимальное возрастание количества зернистых нейронов с высокой c-fos-иммунореактивностью отмечено на 10-е сутки опыта. Это согласуется с данными работы [15], согласно которым при одном и том же экспериментальном воздействии (при раздражении роговицы у мышей) экспрессия c-fos может меняться в структурах мозга по-разному: в одних она уменьшается, а в других возрастает.

В наших предыдущих исследованиях установлено, что морфофункциональные изменения в нейронах коры мозжечка появляются уже на 2-е сутки после перевязки ОЖП и достигают максимума на 10–20-е сутки (пик холестаза). Полученные данные хорошо согласуются с повышением в коре мозжечка количества нейронов с высокой c-fos-иммунореактивностью именно в эти сроки. Увеличение в нейронах белка c-fos можно расценить как адаптационный процесс, направленный на повышение устойчивости нейронов к нарастающему холестазу и компенсации функций погибающих нейронов. В наших предыдущих работах установлены ранние нарушения

в нейронах коры мозжечка митохондрий при холестазах (набухание матрикса, разрушение крист), сопровождающиеся снижением активности маркерных ферментов митохондрий, сукцинат- и НАДН-дегидрогеназы [1, 7]. Считают, что нарушения структуры митохондрий приводят к клеточному стрессу, способствуя увеличению содержания изучаемого белка c-fos как иммуногистохимического маркера повышенной активности нейронов [10, 16, 17].

В отдаленные сроки (на 45–90-е сутки после перевязки ОЖП) после самопроизвольного устранения холестаза (в результате прорастания обходных желчевыводящих путей) все исследованные нами морфофункциональные показатели нейронов коры мозжечка практически приходят к контрольным значениям [7], в частности нормализуется иммунореактивность c-fos.

### Выводы

1. Подпеченочный холестаз у крыс на 2–20-е сутки после перевязки общего желчного протока сопровождается возрастанием в коре мозжечка числа нейронов с повышенной c-fos-иммунореактивностью (пик наблюдается на 10-е сутки опыта).

У выживших животных после устранения холестаза в отдаленные сроки опыта (45–90-е сутки) количество нейронов с повышенной c-fos-иммунореактивностью, а также экспрессия этого белка в нейронах нормализуются.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список использованных источников

1. Емельянич, С. В. Мозг при холестазах / С. В. Емельянич, С. М. Зиматкин. – Гродно : Гродн. гос. ун-т, 2011. – 265 с.
2. Емельянич, С. В. Нарушения в мозге при холестазах и пути коррекции / С. В. Емельянич, С. М. Зиматкин. – Гродно : Гродн. гос. мед. ун-т, 2016. – 224 с.
3. Normal cortical regional cerebral blood flow justifies the normal neuropsychological performance in patients with cholestatic liver disease / M. Senzolo [et al.] // *Psychiatry Clin. Neurosci.* – 2007. – Vol. 61, N 2. – P. 209–210. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2007.01645.x>
4. Behavioral alterations and fos protein immunoreactivity in brain regions of bile duct-ligated cirrhotic rats / L. le Sueur-Maluf [et al.] // *An. Acad. Bras. Cienc.* – 2015. – Vol. 87, N 1. – P. 331–341. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130262>
5. Зиматкин, С. М. Метаболические изменения в гистаминергических нейронах мозга крыс в динамике подпеченочного холестаза / С. М. Зиматкин, О. В. Барабан, С. В. Емельянич // *Морфология.* – 2007. – Т. 132, № 4. – С. 27–30.
6. Емельянич, С. В. Структурные и метаболические изменения в нейронах теменной коры мозга крыс при отведении желчи / С. В. Емельянич, С. М. Зиматкин // *Морфология.* – 2012. – Т. 141, № 2. – С. 7–12.
7. Емельянич, С. В. Структурные и гистохимические изменения в клетках Пуркинье мозжечка крыс при холестазах / С. В. Емельянич, С. М. Зиматкин // *Морфология.* – 2013. – Т. 143, № 2. – С. 019–023.
8. The role of CD4-dependent signaling in interleukin-16 induced c-Fos expression and facilitation of neurite outgrowth in cerebellar granule neurons / C. P. Fenster [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2010. – Vol. 485, N 3. – P. 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.09.014>
9. Distinct regulation of activity-dependent transcription of immediate early genes in cultured rat cortical neurons // M. Fukuchi [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 490, N 3. – P. 682–687. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.101>
10. Moretto, J. N. Acute restraint stress decreases c-fos immunoreactivity in hilar mossy cells of the adult dentate gyrus / J. N. Moretto, Á. M. Duffy, H. E. Scharfman // *Brain Struct. Funct.* – 2017. – Vol. 222, N 5. – P. 2405–2419. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1349-z>
11. Breitman, D. R. Blunted responsiveness of the neuronal activation marker Fos in brainstem cardiovascular nuclei of cirrhotic rats / D. R. Breitman, S. S. Lee // *Hepatology.* – 1997. – Vol. 26, N 6. – P. 1380–1385. <https://doi.org/10.1002/hep.510260601>
12. Working memory impairment and reduced hippocampal and prefrontal cortex c-Fos expression in a rat model of cirrhosis / M. Méndez [et al.] // *Physiol. Behav.* – 2008. – Vol. 95, N 3. – P. 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.06.013>
13. Кизюкевич, Л. С. Реактивные изменения в почках при экспериментальном холестазах / Л. С. Кизюкевич. – Гродно : Гродн. гос. мед. ун-т, 2005. – 239 с.
14. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – 6th ed. – London : Academic Press, 2007. – 448 p.
15. 6 Hz corneal kindling in mice triggers neurobehavioral comorbidities accompanied by relevant changes in c-Fos immunoreactivity throughout the brain / G. Albertini [et al.] // *Epilepsia.* – 2018. – Vol. 59, N 1. – P. 67–78. <https://doi.org/10.1111/epi.13943>
16. Galluzzi, L. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury / L. Galluzzi, K. Blomgren, G. Kroemer // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – Vol. 10, N 7. – P. 481–494. <https://doi.org/10.1038/nrn2665>
17. Lin, M. T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases / M. T. Lin, M. F. Beal // *Nature.* – 2006. – Vol. 443, N 7113. – P. 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>

## References

1. Emel'yanchik S. V., Zimatkin S. M. *Brain after cholestasis*. Grodno, Grodno State University Publ., 2011. 265 p. (in Russian).
2. Emel'yanchik S. V., Zimatkin S. M. *Disturbance in the brain with cholestasis and correction ways*. Grodno, Grodno State Medical University Publ., 2016. 224 p. (in Russian).
3. Senzolo M., Pizzolato G., Dam M., Sturniolo G. C., Burra P. Normal cortical regional cerebral blood flow justifies the normal neuropsychological performance in patients with cholestatic liver disease. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 2007, vol. 61, no. 2, pp. 209–210. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2007.01645.x>
4. Le Sueur-Maluf L., Viana M. B., Nagaoka M. R., Amorim A. L., Cardoso A. N., Rodrigues B. C., Mendes N. F., Bittencourt J. C., Céspedes I. C. Behavioral alterations and fos protein immunoreactivity in brain regions of bile duct-ligated cirrhotic rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2015, vol. 87, no. 1, pp. 331–341. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130262>
5. Zimatkin S. M., Baraban O. V., Emel'yanchik S. V. Metabolic changes in rat brain histaminergic neurons in dynamics of subhepatic cholestasis. *Morfologiya [Morphology]*, vol. 132, no. 4, pp. 27–30 (in Russian).
6. Emel'yanchik S. V., Zimatkin S. M. Structural and histochemical changes in rat parietal cerebral cortex neurons subjected to biliary drainage. *Morfologiya [Morphology]*, vol. 141, no. 2, pp. 7–12 (in Russian).
7. Emel'yanchik S. V., Zimatkin S. M. Structural and histochemical changes in the rat cerebellum Purkinje cells after cholestasis. *Morfologiya [Morphology]*, 2013, vol. 143, no. 2, pp. 019–023 (in Russian).
8. Fenster C. P., Chisnell H. K., Fry C. R., Fenster S. D. The role of CD4-dependent signaling in interleukin-16 induced c-Fos expression and facilitation of neurite outgrowth in cerebellar granule neurons. *Neuroscience Letters*, 2010, vol. 485, no. 3, pp. 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.09.014>
9. Fukuchi M., Sanabe T., Watanabe T., Kubota T., Tabuchi A., Tsuda M. Distinct regulation of activity-dependent transcription of immediate early genes in cultured rat cortical neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, vol. 490, no. 3, pp. 682–687. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.101>
10. Moretto J. N., Duffy Á. M., Scharfman H. E. Acute restraint stress decreases c-fos immunoreactivity in hilar mossy cells of the adult dentate gyrus. *Brain Structure and Function*, 2017, vol. 222, no. 5, pp. 2405–2419. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1349-z>
11. Breitman D. R., Lee S. S. Blunted responsiveness of the neuronal activation marker Fos in brainstem cardiovascular nuclei of cirrhotic rats. *Hepatology*, 1997, vol. 26, no. 6, pp. 1380–1385. <https://doi.org/10.1002/hep.510260601>
12. Méndez M., Méndez-López M., López L., Aller M. A., Arias J., Arias J. L. Working memory impairment and reduced hippocampal and prefrontal cortex c-Fos expression in a rat model of cirrhosis. *Physiology & Behavior*, 2008, vol. 95, no. 3, pp. 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.06.013>
13. Kizyukevich L. S. *Reactive changes in the kidneys in experimental cholestasis*. Grodno, Grodno State Medical University Publ., 2005. 239 p. (in Russian).
14. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th ed. London, Academic Press Publ., 2007. 448 p.
15. Albertini G., Walrave L., Demuyser T., Massie A., De Bundel D., Smolders I. 6 Hz corneal kindling in mice triggers neurobehavioral comorbidities accompanied by relevant changes inc-Fos immunoreactivity throughout the brain. *Epilepsia*, 2018, vol. 59, no. 1, pp. 67–78. <https://doi.org/10.1111/epi.13943>
16. Galluzzi L., Blomgren K., Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009, vol. 10, no. 7, pp. 481–494.
17. Lin M. T., Beal M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006, vol. 443, no. 7113, pp. 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>

## Информация об авторах

Емельянчик Сергей Владимирович – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Гродненский государственный университет им. Я. Купалы (пер. Доватора, 3/1, 230012, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: semel@grsu.by

Карнюшко Ольга Анатольевна – ассистент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: karnyushko-olga@mail.ru

Зиматкин Сергей Михайлович – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: smzimatkina@mail.ru

## Information about the authors

Sergey V. Yemialyanchik – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Head of the Department. Yanka Kupala State University of Grodno (3/1, Dovator Str., 230012, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: semel@grsu.by

Olga A. Karnyushko – Assistant. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus).

Sergey M. Zimatkin – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: smzimatkina@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)  
ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 615.2.615.032:615.038  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-142-150>

Поступила в редакцию 31.05.2018  
Received 31.05.2018

О. А. Антипова<sup>1</sup>, И. П. Жаворонок<sup>1</sup>, Т. О. Павлють<sup>1</sup>, Е. И. Пехтерева<sup>1</sup>, Т. Б. Мелик-Касумов<sup>1</sup>,  
С. А. Кодаленкова<sup>1</sup>, А. Л. Михальчук<sup>2</sup>, М. А. Кисель<sup>2</sup>, А. Ю. Молчанова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

## ХРОНИЧЕСКАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫМИ ФОРМАМИ АМИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**Аннотация.** Производные жирных кислот рассматривают в качестве перспективных субстратов для разработки лекарственных и косметических средств. В этой связи необходимым является изучение их потенциальной токсичности, в том числе и хронической. Повторное введение мышам линии C<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> на протяжении 62 сут *N*-пальмитоилглицина и *N*-пальмитоил-5-аминолевулиновой кислоты (заключенных в липосомы) показало, что действие последней менее токсично, о чем свидетельствует более низкая смертность животных. Выявленные токсические эффекты высоких доз как *PalGly*, так и *Pal-5-ALA* характеризовались гендерной зависимостью: самцы оказались более чувствительными к *PalGly*, тогда как самки – к *Pal-5-Ala*. Хроническое введение липосом на основе фосфатидилхолина (без *N*-ациламино кислот) вызвало гибель отдельных особей, что позволило предположить, что токсическое действие *PalGly* и *Pal-5-ALA* в липосомальной форме обусловлено, как минимум частично, влиянием самих липосом.

**Ключевые слова:** *N*-пальмитоилглицин, *N*-пальмитоил-5-аминолевулиновая кислота, хроническая токсичность, липосомы, выживаемость, летальные дозы

**Для цитирования:** Хроническая интоксикация липосомальными формами амидов жирных кислот в эксперименте / О. А. Антипова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 142–150. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-142-150>

О. А. Antipova<sup>1</sup>, I. P. Zhavoronok<sup>1</sup>, T. O. Pavlut<sup>1</sup>, E. I. Pehtereva<sup>1</sup>, T. B. Melik-Kasumov<sup>1</sup>,  
S. A. Kodalenkova<sup>1</sup>, A. L. Mihal'chuk<sup>2</sup>, M. A. Kisel<sup>2</sup>, A. Yu. Molchanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

## CHRONIC INTOXICATION WITH LIPOSOMAL FATTY ACID AMIDES IN THE EXPERIMENT

**Abstract.** The derivatives of fatty acids are considered as promising bases for the development of medicinal and cosmetic agents. In this regard, it is necessary to study their potential toxicity, including chronic. In repeated toxicity experiments on mice of C57BL6 line, the administration of *N*-palmitoyl-5-aminolevulinic acid (within liposomes) for 62 days was less toxic than *N*-palmitoylglycine injected in the same regimen, which resulted in lower mortality of animals. The toxic effects of high doses, both *PalGly* and *Pal-5-ALA*, are characterized by a gender dependence: males were more sensitive to *PalGly*, whereas females – to *Pal-5-Ala*. Chronic administration of liposomes of phosphatidylcholine (without *N*-acylamino acids) caused the death of several mice, suggesting that the toxic effects of *PalGly* and *Pal-5-ALA* in liposomal form are at least partly due to the influence of the liposomes themselves.

**Keywords:** *N*-palmitoylglycine, *N*-palmitoyl-5-aminolevulinic acid, chronic toxicity, liposomes, survival, lethal doses

**For citation:** Antipova O. A., Zhavoronok I. P., Pavlut T. O., Pehtereva E. I., Melik-Kasumov T. B., Kodalenkova S. A., Mihal'chuk A. L., Kisel M. A., Molchanova A. Yu. Chronic intoxication with liposomal fatty acid amides in the experiment. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 142–150 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-142-150>

**Введение.** Одним из активно развивающихся направлений современной фармакологии является изучение физиологических эффектов липидных сигнальных молекул, играющих важную роль во внутри- и межклеточных коммуникациях. К таким молекулам в последнее десятилетие относят и *N*-ацильные конъюгаты аминокислот и длинноцепочечных жирных кислот.

В настоящее время известно около 70 эндогенных *N*-ациламино кислот. Физиологическая роль большинства из них пока не ясна [1, 2], однако некоторые представители этого семейства липидных молекул, такие как *N*-пальмитоилглицин (*PalGly*), *N*-пальмитоил-5-аминолевулиновая

кислота (*Pal-5-ALA*) и др., считаются перспективными субстратами для разработки новых лекарственных средств. В частности, получены экспериментальные свидетельства их выраженного антиноцицептивного эффекта [3]. Вместе с тем необходимо дальнейшее тщательное изучение как протекторных физиологических эффектов указанных липидных сигнальных соединений, так и их возможного негативного влияния и токсического действия.

Цель настоящей работы – оценить токсичность *N*-пальмитоилглицина и *N*-пальмитоил-5-аминолевулиновой кислоты при хроническом их введении и выявить наиболее чувствительные органы-мишени у мышей линии  $C_{57}BL_6$ .

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты проведены на 171 половозрелой мыши линии  $C_{57}BL_6$  обоего пола (86 самцах и 85 самках) массой 15–16 г.

Животных содержали в виварии Института физиологии НАН Беларуси в соответствии с установленными нормами. Эксперименты проводили с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными согласно национальным и международным стандартам качества планирования и проведения исследований [4–8].

До начала исследования животные в течение 5–7 сут находились в клетках на карантине для адаптации. В течение этого периода проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние). Перед началом исследования животных, отвечающих критериям включения в эксперимент (активные, подвижные, с гладким, блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, охотно поедающие корм), были разделены на группы методом рандомизации. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер [4–8].

Эмульсии липосом, состоящие из фосфатидилхолина (ФХ) с включением *PalGly* или *Pal-5-ALA*, были синтезированы в лаборатории химии липидов ИБОХ НАН Беларуси. Массовая концентрация ФХ в эмульсии составляла 6,75 мг/мл, *PalGly* – 2,35, *Pal-5-ALA* – 2,77 мг/мл. Различия в массовой концентрации *PalGly* и *Pal-5-ALA* допущены с целью получения их одинаковой молярной концентрации – 7,5 мкмоль/мл.

Индивидуальный вводимый объем *PalGly* и *Pal-5-ALA* рассчитывали исходя из массы тела каждого животного, а при длительном введении его корректировали после каждого взвешивания 1 раз в неделю. Точности дозирования достигали путем изменения объема вводимого раствора при его постоянной концентрации. Дозирование осуществляли, учитывая содержание активных компонентов (*PalGly* и *Pal-5-ALA*). Для сравнения отдельной группе животных вводили ФХ (тем же способом, что и *PalGly* и *Pal-5-ALA*) в 10-кратной разовой дозе (из расчета 0,2 мл на животное массой 20 г). Контролем служили интактные животные.

В зависимости от вводимой дозы животные были разделены на экспериментальные группы (наименьшая разовая доза (7,5 мкмоль/кг) – 11 самцов и 10 самок для введения *NPalGly*, 10 самцов и 11 самок для введения *Pal-5-ALA*; 5-кратная разовая доза (37,5 мкмоль/кг) – по 11 самцов и самок для введения *PalGly*, 12 самцов и 10 самок для введения *Pal-5-ALA*; 10-кратная разовая доза (75 мкмоль/кг) – 10 самцов и 12 самок для введения *PalGly*, по 11 самцов и самок для введения *Pal-5-ALA*) и контрольные группы (10-кратная разовая доза липосом на основе ФХ (растворитель) – 22 особи (по 12 самцов и 10 самок), интактные животные – 9 самцов и 10 самок).

*PalGly* и *Pal-5-ALA* вводили однократно ежедневно внутривентриально в трех дозах. По результатам исследования острой токсичности наименьшая разовая доза (из расчета 0,02 мл на животное массой 20 г) составляла 7,5 мкмоль/кг (*PalGly* – 2,35 мг/кг, *Pal-5-ALA* – 2,77 мг/кг), 5-кратная разовая доза (из расчета 0,1 мл на животное массой 20 г) – 37,5 мкмоль/кг (*PalGly* – 11,76 мг/кг, *Pal-5-ALA* – 13,86 мг/кг), 10-кратная разовая доза (из расчета 0,2 мл на животное массой 20 г) – 75 мкмоль/кг (*PalGly* – 23,51 мг/кг, *Pal-5-ALA* – 27,72 мг/кг). Общий период наблюдения составил 62 дня, при этом регистрировали время гибели, сроки развития и картину интоксикации, выживаемость, внешний вид, поведение, массу тела, потребление пищи и воды.

Выживших после введения тестируемых соединений особей на 63-и сутки подвергали эвтаназии. Всех животных (в том числе погибших в ходе эксперимента) подвергали некропсии и направляли на вскрытие для выявления макроскопически различимых признаков патологии внутренних органов. При некропсии исследовали внешнее состояние тела, грудную, брюшную и тазовую полости и проводили забор органов (легкие, сердце, печень, селезенка, почки, надпочечники и тимус) для определения их массы. Животных взвешивали перед вскрытием для рас-

чета массового коэффициента (МК). МК, интегральный показатель, используемый в токсикологии для оценки состояния внутренних органов (дает возможность выявления органа-мишени), рассчитывали по следующей формуле [9]:  $МК = \text{масса органа (г)}/\text{масса тела (г)} \cdot 100 \%$ .

Анализ данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel с определением среднего арифметического значения и его стандартной ошибки  $M \pm m$ . Проверку на нормальность распределения количественных показателей осуществляли по критерию Шапиро–Уилка, значимость наблюдаемых отличий, ввиду относительно небольших размеров выборок, оценивали по  $U$ -критерию Манна–Уитни с помощью программы Statistica 10.0. В процессе обработки за уровень статистической значимости принимали  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Общее состояние и поведение животных на протяжении первых 30 сут наблюдения были удовлетворительными: шерстный покров яркий, блестящий, гладкий, без очагов облысения, кожа бледно-розовая, эластичная, подвижная, без повреждений. Начиная с 31-х суток сначала у самцов, которым вводили *Pal-5-ALA*, а затем и у отдельных особей (самцов и самок) из других групп отмечали алопецию в области головы, спины и брюха. Появились покраснения и шелушения кожи, а также ранки и царапины в области живота, особенно в месте инъекции. Видимые слизистые оболочки (глаз, носовой, ротовой полостей) бледно-розовые, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений. Патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали. Животные были активны, подвижны, реагировали на раздражители, охотно поедали корм и потребляли воду. Однако у отдельных особей (перед смертью) происходило снижение двигательной активности: мыши были вялые, апатичные, заторможенные, по клетке передвигались неактивно. В основном животные погибали в ночное время.

На протяжении всего периода наблюдения зафиксирована гибель 36 животных: 4 самцов и 5 самок после введения ФХ; 3 самцов и 3 самок после инъекции *PalGly* в дозе 7,5 мкмоль/кг; 5 самцов и 5 самок после инъекции *PalGly* в дозе 37,5 мкмоль/кг; 3 самцов и 3 самок после введения *PalGly* в дозе 75 мкмоль/кг. Введение *Pal-5-ALA* привело к гибели меньшего количества животных: 1 самца и 1 самки после введения дозы 7,5 мкмоль/кг; 1 самца и 1 самки после инъекции в дозе 37,5 мкмоль/кг; 1 самки после введения дозы 75 мкмоль/кг. Смертность не носила дозозависимый характер.

Динамика гибели экспериментальных животных была следующей: после инъекции ФХ на 2-е сутки пал 1 самец, гибель самцов в этой группе наблюдалась также на 51, 55 и 56-е сутки. После введения ФХ зафиксирована смерть 5 самок на 11, 43, 51, 60-е и 63-и сутки. *PalGly* в дозе 7,5 мкмоль/кг привел к гибели 3 самцов (32-е, 48-е и 53-и сутки) и 3 самок (56-е и 62-е сутки). Ежедневные инъекции *PalGly* в дозе 37,5 мкмоль/кг вызвали смерть 2 самцов на 45-е сутки, 2 – на 54-е и 1 – на 58-е. После введения *PalGly* в дозе 37,5 мкмоль/кг зафиксирована гибель 5 самок на 45, 47, 48, 49 и 61-е сутки. В группе животных, которым инъецировали *PalGly* в дозе 75 мкмоль/кг, помимо самца, павшего спустя 4–5 ч после инъекции в 1-е сутки, зафиксирована гибель еще 2 самцов на 45-е и 50-е сутки и 3 самок на 54-е и 60-е сутки. Среди мышей, которым вводили *Pal-5-ALA* в дозе 7,5 мкмоль/кг, зафиксирована гибель 1 самца (на 23-и сутки) и 1 самки (на 55-е сутки). После введения *Pal-5-ALA* в дозе 37,5 мкмоль/кг также пало 2 животных: 1 самец (на 22-е сутки) и 1 самка (на 52-е сутки). Ежедневное введение *Pal-5-ALA* в дозе 75 мкмоль/кг привело к гибели лишь 1 самки (58-е сутки). Смертность животных, получавших *PalGly*, была выше, но наступала позже, чем у мышей в группах, получавших *Pal-5-ALA*.

На протяжении всего эксперимента показатели массы тела самцов и самок, ежедневно получавших инъекции ФХ, *PalGly*, и интактных животных существенно не отличались между собой (табл. 1, 2). При сравнении с животными, получавшими ФХ, введение *PalGly* самцам в дозе 75 мкмоль/кг на 14-е сутки способствовало увеличению массы тела на 12 % (табл. 1). Также после инъекций самкам *PalGly* в максимальной дозе отмечалось увеличение массы тела по сравнению с животными, получавшими ФХ, на 56-е (на 22 %) и 63-и (на 28 %) сутки (табл. 2). Введение *Pal-5-ALA* в дозе 7,5 мкмоль/кг самцам (на 21-е и 35-е сутки) приводило к снижению массы тела в среднем на 16 % по сравнению с контролем (табл. 1). В свою очередь после введения самцам *Pal-5-ALA* в дозе 37,5 мкмоль/кг на 21, 28 и 49-е сутки происходило уменьшение массы тела по сравнению с интактными животными на 15, 13 и 6 % соответственно (см. табл. 1). Отмечено,

что прирост массы тела у самцов, получавших *Pal-5-ALA* в относительно высоких дозах (37,5 и 75 мкмоль/кг), был значительно меньше, чем в контрольной группе (табл. 1). Ежедневные инъекции *Pal-5-ALA* самкам, независимо от дозы, не вызывали существенных изменений массы тела по сравнению как с интактными животными, так и с животными, получавшими ФХ (табл. 2).

После прекращения введения *PalGly*, *Pal-5-ALA* и ФХ выживших животных подвергали эвтаназии, направляли на вскрытие и патоморфологическое исследование. Внешний осмотр трупов мышей (как самцов, так и самок, которым вводили тестируемые вещества) показал, что у отдельных особей имело место выпадение шерсти в области головы, спины и брюха, а на коже – покраснение и шелушение, особенно в месте инъекции. Патологические выделения из естественных отверстий тела у животных всех экспериментальных групп отсутствовали. При вскрытии грудной, брюшной и тазовой полостей отмечалось анатомически правильное расположение внутренних органов. Грудная и брюшная полости выпота не содержали. Однако на серозных оболочках внутренних органов брюшной полости в группах животных, которым вводили большие объемы эмульсий, отмечался характерный мелкозернистый белый налет, образовавшийся, по-видимому, вследствие недостаточной скорости всасывания липидов из брюшной полости. Форма сердца визуально не изменена, однако его размеры меньше по сравнению с контролем (табл. 3, 4). Форма селезенки по сравнению с таковой у интактных животных не изменена, однако у самок введение *PalGly* в большей степени, чем *Pal-5-ALA*, приводило к увеличению ее размеров (табл. 4). Не выявлено отклонений формы печени от нормы, но у самцов размеры этого органа после ежедневных инъекций *Pal-5-ALA* уменьшались по сравнению с контролем, а у самок при введении *PalGly* увеличивались (табл. 3, 4). Масса легких и почек экспериментальных животных не имели существенных сдвигов относительно интактных самок (табл. 4), в то время как у самцов, получавших *PalGly*, масса легких увеличивалась по сравнению с мышами, которым вводили ФХ (см. табл. 3), а у самцов, получавших *Pal-5-ALA*, масса легких и почек уменьшались по сравнению с контролем (табл. 3). Форма надпочечников существенно не отличалась от таковой у интактных животных, в то же время у самцов введение тестируемых веществ приводило к укрупнению органа. Масса тимуса самок не отличалась от аналогичного показателя у интактных мышей, за исключением снижения массы тимуса у группы животных, инъецированных ФХ (табл. 4). У самцов массы органа были снижены по сравнению с контролем (табл. 4).

Изменения массы внутренних органов, вызванные как *PalGly*, так и *Pal-5-ALA*, характеризовались четкой гендерной зависимостью. В то же время зависимости эффекта от дозы тестируемых веществ не прослеживалось. У самцов *PalGly* индуцировал увеличение массы надпочечников (при введении в дозе 7,5 мкмоль/кг – на 68 %,  $p = 0,020$ , а при дозе 37,5 мкмоль/кг – на 111 %,  $p = 0,005$ ) и уменьшение массы тимуса (на 51 % при дозе 7,5 мкмоль/кг,  $p = 0,001$ ) (табл. 3). Изменения массы внутренних органов, вызванные введением *PalGly*, у самок носили иной характер: повторное введение липида в дозе 37,5 мкмоль/кг приводило к гепатомегалии (на 21 %,  $p = 0,031$ ), а в дозе 75 мкмоль/кг (на 48 % по сравнению с мышами, получавшими ФХ,  $p = 0,019$ ) – к спленомегалии в той же дозе (на 72 % по сравнению с контролем,  $p = 0,003$ ; на 74 % по сравнению с ФХ,  $p = 0,042$ ) (табл. 4).

Длительное введение *Pal-5-ALA* самцам сопровождалось более выраженными, чем при введении *PalGly*, изменениями, что выражалось в уменьшении массы сердца (независимо от дозы, приблизительно на 27 %,  $p < 0,025$ ), печени (на 29 % при дозе 37,5 мкмоль/кг,  $p = 0,003$ ; на 20 % при дозе 75 мкмоль/кг,  $p = 0,038$ ), массы почек (на 26 % при дозе 37,5 мкмоль/кг,  $p = 0,012$ ), легких (на 24 % при дозе 37,5 мкмоль/кг,  $p = 0,046$ ), инволюции тимуса (независимо от дозы,  $p < 0,031$ ) и адреномегалией (на 44 % при дозе 7,5 мкмоль/кг,  $p = 0,008$ ) (см. табл. 3). У самок введение этого же липида на протяжении 62 сут приводило к уменьшению массы сердца (на 19 % при дозе 7,5 мкмоль/кг,  $p = 0,035$ ) и спленомегалии (на 66 % при дозе 37,5 мкмоль/кг,  $p = 0,028$ ) по сравнению с таковыми у интактных животных (табл. 4).

Динамика изменения МК внутренних органов имела схожую направленность, что и изменение их массы (табл. 5, 6). Вместе с тем зафиксированы и некоторые отличия. У самцов, которым ежедневно вводили ФХ, отмечался рост МК селезенки на 47 % по сравнению с интактными животными,  $p = 0,027$  (табл. 5). У самок после инъекций ФХ отмечалось снижение МК тимуса на 60 % по сравнению с контролем,  $p = 0,005$  (табл. 6). Длительное введение *PalGly* самцам помимо

Т а б л и ц а 1. Масса тела мышей-самцов после повторного внутривентрального введения ФХ, *PalGly* и *Pal-5-ALA*, г ( $M \pm m$ )Т а б л и ц а 1. Body weights of male mice after repeated intraperitoneal injection of Phosphatidylcholine (ФХ), *PalGly* and *Pal-5-ALA*, g ( $M \pm m$ )

Препарат и вводимая доза	0-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	35-е сутки	42-е сутки	49-е сутки	56-е сутки	63-й сутки
Контроль (интактные животные)	15,2 ± 1,1	17,6 ± 1,1	17,6 ± 0,9	18,8 ± 0,8	19,2 ± 0,8	20,3 ± 1,0	20,7 ± 1,0	20,7 ± 1,3	20,4 ± 1,1	21,0 ± 1,3
ФХ	16,5 ± 0,7	17,9 ± 0,7	16,5 ± 0,7	17,3 ± 0,8	18,2 ± 0,8	18,4 ± 0,9	18,5 ± 0,9	17,2 ± 1,2	17,6 ± 1,2	18,1 ± 1,3
<i>PalGly</i> , мкмоль/кг:										
7,5	14,7 ± 0,9	16,0 ± 1,1	16,7 ± 0,9	17,6 ± 1,1	16,6 ± 1,1	17,9 ± 1,4	18,5 ± 1,5	18,2 ± 1,7	19,6 ± 1,7	20,5 ± 1,8
37,5	15,5 ± 0,8	17,1 ± 0,9	17,4 ± 0,9	18,5 ± 0,8	17,6 ± 0,8	19,4 ± 0,9	19,3 ± 1,1	17,8 ± 1,7	19,6 ± 1,5	21,8 ± 1,5
75	16,9 ± 0,8	18,2 ± 0,6	18,4 ± 0,6#	19,1 ± 0,6	18,7 ± 0,6	19,8 ± 0,9	19,4 ± 0,8	19,5 ± 1,2	19,7 ± 1,0	19,4 ± 0,8
<i>Pal-5-ALA</i> , мкмоль/кг:										
7,5	15,4 ± 1,0	16,1 ± 0,9	16,1 ± 0,9	15,9 ± 1,0*	16,7 ± 1,1	16,9 ± 1,1*	18,1 ± 1,1	19,3 ± 1,4	19,6 ± 1,2	20,0 ± 1,3
37,5	15,8 ± 0,8	16,4 ± 1,0	15,3 ± 1,0	14,1 ± 1,3*	15,6 ± 1,2*	16,7 ± 1,2	17,1 ± 1,2	16,7 ± 1,2*	17,3 ± 1,1	17,4 ± 1,1
75	16,4 ± 1,2	17,2 ± 1,0	17,0 ± 0,9	16,6 ± 0,8	16,5 ± 0,9	18,1 ± 0,9	18,0 ± 1,0	18,0 ± 1,2	18,3 ± 1,2	18,3 ± 1,2

П р и м е ч а н и е. Достоверность отличий ( $p < 0,05$ ): \* – от интактных мышей; # – от мышей, получавших ФХ (только для *PalGly* и *Pal-5-ALA* в дозе 75 мкмоль/кг). То же в табл. 2–6.

Т а б л и ц а 2. Масса тела мышей-самок после повторного внутривентрального введения ФХ, *PalGly* и *Pal-5-ALA*, г ( $M \pm m$ )Т а б л и ц а 2. Body weights of female mice after repeated intraperitoneal injection of Phosphatidylcholine (ФХ), *PalGly* and *Pal-5-ALA*, g ( $M \pm m$ )

Препарат и вводимая доза	0-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	35-е сутки	42-е сутки	49-е сутки	56-е сутки	63-й сутки
Контроль (интактные животные)	15,3 ± 0,6	16,3 ± 0,7	16,3 ± 0,6	17,0 ± 0,9	17,0 ± 0,9	18,1 ± 0,9	17,3 ± 0,8	17,0 ± 0,9	16,8 ± 0,9	17,6 ± 0,7
ФХ	15,2 ± 1,0	15,6 ± 1,0	15,6 ± 0,8	17,3 ± 1,0	16,4 ± 0,8	17,2 ± 0,8	16,3 ± 0,7	15,6 ± 1,0	15,1 ± 0,8	15,2 ± 1,1
<i>PalGly</i> , мкмоль/кг:										
7,5	15,0 ± 1,1	16,4 ± 1,0	14,8 ± 0,8	16,2 ± 0,8	16,8 ± 0,8	18,1 ± 0,7	18,6 ± 0,7	17,0 ± 0,7	16,0 ± 0,6	16,6 ± 1,2
37,5	15,6 ± 1,2	16,5 ± 1,2	15,3 ± 1,2	16,6 ± 1,1	17,1 ± 1,0	17,7 ± 0,9	17,3 ± 1,1	17,7 ± 1,4	17,4 ± 1,3	18,8 ± 1,6
75	14,8 ± 0,6	16,1 ± 0,6	15,8 ± 0,8	17,2 ± 0,7	18,0 ± 0,7	18,2 ± 0,7	18,7 ± 0,9	17,1 ± 1,0	18,4 ± 1,0#	19,4 ± 1,3#
<i>Pal-5-ALA</i> , мкмоль/кг:										
7,5	14,5 ± 1,0	16,0 ± 0,6	15,0 ± 0,8	17,2 ± 0,7	17,2 ± 0,7	17,1 ± 0,7	17,1 ± 1,0	16,4 ± 0,9	16,2 ± 0,9	16,2 ± 1,1
37,5	15,2 ± 1,1	16,8 ± 0,9	15,6 ± 1,0	16,3 ± 0,9	16,6 ± 1,0	16,9 ± 0,8	16,6 ± 0,8	17,6 ± 0,8	16,6 ± 1,0	17,4 ± 1,0
75	15,3 ± 0,7	15,0 ± 0,6	15,0 ± 0,8	15,5 ± 0,8	16,1 ± 0,7	16,8 ± 0,7	16,5 ± 0,8	14,8 ± 1,3	14,8 ± 1,1	16,7 ± 1,2

Т а б л и ц а 3. Масса внутренних органов мышей-самцов после 62 сут ежедневного внутрибрюшинного введения ФХ, *PalGly* и *Pal-5-ALA*, г (M ± m)  
 T a b l e 3. The mass of internal organs of male mice after 62 days of daily intraperitoneal administration of Phosphatidylcholine (ФХ), *PalGly* and *Pal-5-ALA*, g (M ± m)

Препарат и вводимая доза	Сердце	Легкие	Печень	Селезенка	Почки	Надпочечники	Тимус
Контроль (интактные животные)	0,101 ± 0,008	0,152 ± 0,018	1,083 ± 0,070	0,091 ± 0,016	0,227 ± 0,019	0,004 ± 0,001	0,030 ± 0,004
ФХ	0,085 ± 0,004	0,126 ± 0,007	0,927 ± 0,091	0,108 ± 0,013	0,201 ± 0,015	0,006 ± 0,001	0,025 ± 0,005
<i>PalGly</i> , мкмоль/кг:							
7,5	0,092 ± 0,008	0,164 ± 0,015	1,055 ± 0,075	0,120 ± 0,019	0,205 ± 0,020	0,007 ± 0,001*	0,015 ± 0,002*
37,5	0,096 ± 0,017	0,151 ± 0,012	1,185 ± 0,074	0,119 ± 0,018	0,256 ± 0,018	0,009 ± 0,001*	0,030 ± 0,007
75	0,094 ± 0,007	0,163 ± 0,011#	1,069 ± 0,053	0,130 ± 0,011	0,206 ± 0,013	0,006 ± 0,001	0,020 ± 0,003
<i>Pal-5-ALA</i> , мкмоль/кг:							
7,5	0,074 ± 0,004*	0,128 ± 0,007	0,966 ± 0,066	0,087 ± 0,007	0,198 ± 0,017	0,006 ± 0,002*	0,020 ± 0,004*
37,5	0,073 ± 0,004*	0,116 ± 0,006*	0,764 ± 0,050*	0,054 ± 0,006	0,166 ± 0,013*	0,005 ± 0,000	0,020 ± 0,004*
75	0,075 ± 0,005*	0,137 ± 0,006	0,862 ± 0,063*	0,089 ± 0,007	0,199 ± 0,018	0,006 ± 0,001	0,018 ± 0,001*

Т а б л и ц а 4. Масса внутренних органов мышей-самок после 62 сут ежедневного внутрибрюшинного введения ФХ, *PalGly* и *Pal-5-ALA*, г (M ± m)  
 T a b l e 4. The mass of the internal organs of female mice after 62 days of daily intraperitoneal administration of Phosphatidylcholine (ФХ), *PalGly* and *Pal-5-ALA*, g (M ± m)

Препарат и вводимая доза	Сердце	Легкие	Печень	Селезенка	Почки	Надпочечники	Тимус
Контроль (интактные животные)	0,085 ± 0,004	0,160 ± 0,021	0,815 ± 0,044	0,069 ± 0,008	0,166 ± 0,017	0,006 ± 0,001	0,026 ± 0,004
ФХ	0,070 ± 0,007	0,119 ± 0,016	0,655 ± 0,096	0,063 ± 0,014	0,154 ± 0,016	0,006 ± 0,001	0,009 ± 0,001*
<i>PalGly</i> , мкмоль/кг:							
7,5	0,071 ± 0,006	0,135 ± 0,012	0,736 ± 0,065	0,086 ± 0,013	0,149 ± 0,007	0,007 ± 0,001	0,021 ± 0,005
37,5	0,088 ± 0,010	0,110 ± 0,012	0,986 ± 0,103*	0,118 ± 0,028	0,180 ± 0,015	0,005 ± 0,000	0,022 ± 0,005
75	0,075 ± 0,006	0,132 ± 0,013	0,968 ± 0,060#	0,110 ± 0,010*#	0,186 ± 0,011	0,004 ± 0,001	0,026 ± 0,005
<i>Pal-5-ALA</i> , мкмоль/кг:							
7,5	0,069 ± 0,005*	0,121 ± 0,008	0,718 ± 0,049	0,070 ± 0,007	0,146 ± 0,010	0,005 ± 0,001	0,017 ± 0,002
37,5	0,078 ± 0,005	0,125 ± 0,010	0,877 ± 0,061	0,094 ± 0,009*	0,183 ± 0,012	0,005 ± 0,001	0,027 ± 0,004
75	0,084 ± 0,011	0,206 ± 0,091	0,838 ± 0,071	0,114 ± 0,018	0,161 ± 0,013	0,004 ± 0,000	0,022 ± 0,003#

Т а б л и ц а 5. Массовые коэффициенты внутренних органов мышей-самцов после 62 сут ежедневного внутривенного введения ФХ, *PalGly* и *Pal-5-ALA*, % (M ± m)

Т а б л и ц а 6. Массовые коэффициенты внутренних органов мышей-самцов после 62 сут ежедневного внутривенного введения ФХ, *PalGly* и *Pal-5-ALA*, % (M ± m)

Препарат и вводимая доза	Сердце	Легкие	Печень	Селезенка	Почки	Надпочечники	Тимус
Контроль (интактные животные)	0,482 ± 0,017	0,725 ± 0,081	5,181 ± 0,178	0,426 ± 0,065	1,077 ± 0,036	0,021 ± 0,003	0,142 ± 0,011
ФХ	0,478 ± 0,025	0,719 ± 0,057	5,088 ± 0,371	0,625 ± 0,101*	1,118 ± 0,061	0,039 ± 0,009	0,142 ± 0,027
<i>PalGly</i> , мкмоль/кг:							
7,5	0,448 ± 0,016	0,861 ± 0,130	5,214 ± 0,142	0,595 ± 0,081*	0,998 ± 0,026	0,036 ± 0,004*	0,072 ± 0,006*
37,5	0,442 ± 0,022	0,696 ± 0,046	5,452 ± 0,190	0,540 ± 0,075	1,176 ± 0,044	0,042 ± 0,008*	0,130 ± 0,031
75	0,482 ± 0,022	0,844 ± 0,055	5,516 ± 0,203	0,664 ± 0,043*	1,054 ± 0,026	0,031 ± 0,004*	0,100 ± 0,015
<i>Pal-5-ALA</i> , мкмоль/кг:							
7,5	0,379 ± 0,018*	0,661 ± 0,054	4,856 ± 0,158	0,443 ± 0,036	0,989 ± 0,059*	0,032 ± 0,003*	0,099 ± 0,015*
37,5	0,427 ± 0,022*	0,696 ± 0,054	4,437 ± 0,144*	0,307 ± 0,022	0,973 ± 0,075*	0,033 ± 0,004*	0,122 ± 0,022
75	0,411 ± 0,012#	0,779 ± 0,053	4,764 ± 0,246	0,490 ± 0,031	1,073 ± 0,033	0,032 ± 0,003*	0,108 ± 0,014*

Т а б л и ц а 6. Массовые коэффициенты внутренних органов мышей-самок после 62 сут ежедневного внутривенного введения ФХ, *PalGly* и *Pal-5-ALA*, % (M ± m)

Т а б л и ц а 7. Массовые коэффициенты внутренних органов мышей-самок после 62 сут ежедневного внутривенного введения ФХ, *PalGly* и *Pal-5-ALA*, % (M ± m)

Препарат и вводимая доза	Сердце	Легкие	Печень	Селезенка	Почки	Надпочечники	Тимус
Контроль (интактные животные)	0,487 ± 0,020	0,912 ± 0,104	4,640 ± 0,195	0,391 ± 0,042	0,932 ± 0,069	0,034 ± 0,004	0,149 ± 0,018
ФХ	0,461 ± 0,036	0,771 ± 0,059	4,233 ± 0,443	0,406 ± 0,086	1,002 ± 0,047	0,037 ± 0,005	0,060 ± 0,009*
<i>PalGly</i> , мкмоль/кг:							
7,5	0,434 ± 0,035	0,822 ± 0,062	4,479 ± 0,324	0,507 ± 0,055	0,915 ± 0,040	0,041 ± 0,006	0,127 ± 0,028
37,5	0,476 ± 0,045	0,592 ± 0,052*	5,187 ± 0,218	0,590 ± 0,121	0,975 ± 0,069	0,027 ± 0,002	0,119 ± 0,027
75	0,385 ± 0,016*	0,676 ± 0,035	5,014 ± 0,175	0,577 ± 0,051*	0,961 ± 0,030	0,024 ± 0,005	0,125 ± 0,022
<i>Pal-5-ALA</i> , мкмоль/кг:							
7,5	0,428 ± 0,015*	0,759 ± 0,040	4,432 ± 0,087	0,432 ± 0,039	0,900 ± 0,020	0,029 ± 0,003	0,105 ± 0,014
37,5	0,446 ± 0,018	0,717 ± 0,042	5,007 ± 0,123	0,554 ± 0,061*	1,052 ± 0,036*	0,030 ± 0,004	0,150 ± 0,020
75	0,533 ± 0,095	1,315 ± 0,612	5,025 ± 0,204	0,675 ± 0,095*	0,969 ± 0,046	0,027 ± 0,002	0,130 ± 0,017#

повышения МК надпочечников (независимо от дозы,  $p < 0,031$ ) и инволюции тимуса (уменьшения МК на 48 % при дозе 7,5 мкмоль/кг,  $p = 0,00008$ ) сопровождалось также повышением МК селезенки (на 40 % при дозе 7,5 мкмоль/кг,  $p = 0,035$ ; на 56 % при дозе 75 мкмоль/кг,  $p = 0,031$ ) (см. табл. 5). У самок, получавших *PalGly*, зафиксировано снижение МК легких (на 35 % при дозе 37,5 мкмоль/кг,  $p = 0,022$ ), сердца (на 21 % при дозе 75 мкмоль/кг,  $p = 0,001$ ) одновременно с увеличением МК селезенки (на 47 % при дозе 75 мкмоль/кг,  $p = 0,010$ ) (табл. 6). Длительное введение самцам *Pal-5-ALA* приводило к снижению МК сердца (независимо от дозы,  $p < 0,033$ ), печени (на 14 % при дозе 37,5 мкмоль/кг,  $p = 0,002$ ), почек (на 8 % при дозе 7,5 мкмоль/кг,  $p = 0,024$ ; на 10 % при дозе 37,5 мкмоль/кг,  $p = 0,046$ ) и тимуса (на 30 % при дозе 7,5 мкмоль/кг,  $p = 0,031$ ; на 24 % при дозе 75 мкмоль/кг,  $p = 0,020$ ). В то же время МК надпочечников возрастал (независимо от дозы,  $p < 0,038$ ) (см. табл. 5). У самок в результате длительного введения снижались МК сердца (на 12 % при дозе 7,5 мкмоль/кг,  $p = 0,043$ ) и увеличивались МК селезенки (на 42 % при дозе 37,5 мкмоль/кг,  $p = 0,028$ ; на 72 % при дозе 75 мкмоль/кг,  $p = 0,003$ ) и почек (на 13 % при дозе 37,5 мкмоль/кг,  $p = 0,022$ ) (табл. 6).

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что хроническая интоксикация мышей *PalGly* и *Pal-5-ALA*, а именно длительное, в течение 62 сут, ежедневное внутрибрюшинное введение препаратов приводит к гибели животных. При этом *Pal-5-ALA* оказался менее токсичным по сравнению с *PalGly*, о чем свидетельствовала более низкая смертность животных.

Количество павших животных не зависело от дозы *PalGly* или *Pal-5-ALA*. Следует отметить, что введение ФХ также сопровождалось летальными эффектами, и это дало основание полагать, что токсическое действие тестируемых субстанций вызвано, как минимум частично, самими липосомами.

Несмотря на отсутствие существенной разницы между числом павших самок и самцов, токсические эффекты *PalGly* и *Pal-5-ALA* характеризовались гендерной зависимостью. Наиболее чувствительными к *PalGly* органами у самцов оказались селезенка, надпочечники и тимус, у самок – печень, селезенка и (в меньшей степени) легкие. Действие *Pal-5-ALA* сказывалось у самцов в основном на сердце, печени, почках, надпочечниках и тимусе, тогда как у самок – на сердце, селезенке, тимусе и (в меньшей степени) на почках. Хроническое ведение ФХ также вызывало гибель отдельных особей, что позволило предположить, что токсическое действие *PalGly* и *Pal-5-ALA* при повторном введении в липосомальной форме обусловлено, как минимум частично, влиянием самих липосом.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список использованных источников

1. Connor, M. N-acyl amino acids and N-acyl neurotransmitter conjugates: neuromodulators and probes for new drug targets / M. Connor, C. W. Vaughan, R. J. Vandenberg // Brit. J. Pharmacol. – 2010. – Vol. 160, N 8. – P. 1857–1871. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00862.x>
2. Grabiec, U. N-arachidonoyl dopamine: a novel endocannabinoid and endovanilloid with widespread physiological and pharmacological activities / U. Grabiec, F. Dehghani // Cannabis and Cannabinoid Res. – 2017. – Vol. 2, N 1. – P. 183–196. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0015>
3. Оценка антиноцицептивного действия амидов пальмитиновой кислоты / Т. Б. Мелик-Касумов [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2016. – № 4. – С. 25–31.
4. Санитарные правила и нормы 2.1.2.12–18–2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)»: утв. Постановлением Гл. гос. санитар. врача Респ. Беларусь, 31 окт. 2006 г., № 131.
5. Ветеринарно-санитарные правила по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках: утв. Постановлением М-ва сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, № 36, 21 мая 2010 г.: с изм. и доп. от 26 окт. 2016 г., № 63 // Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://mshp.gov.by/documents/technical-acts/cb5d27ea51a49bea.html>. – Дата доступа: 07.04.2019.
6. Принципы надлежащей лабораторной практики: ГОСТ 33044-2014. – М.: Стандартинформ, 2015. – 16 с.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: в 2 ч. / редкол.: А. Н. Миронов (председатель) [и др.]. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
8. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes, n 123 of 18 march 1986; protocol of amendment to the european convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 22 June 1998. – 48 с.
9. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / Т. В. Абрашова [и др.]; под ред. В. Г. Макарова, М. Н. Макаровой. – СПб.: Лема, 2013. – 116 с.

## References

1. Connor M., Vaughan C. W., Vandenberg R. J. N-acyl amino acids and N-acyl neurotransmitter conjugates: neuromodulators and probes for new drug targets. *British Journal of Pharmacology*, 2010, vol. 160, no. 8, pp. 1857–1871. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00862.x>
2. Grabiec U., Dehghani F. N-arachidonoyl dopamine: a novel endocannabinoid and endovanilloid with widespread physiological and pharmacological activities. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 183–196. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0015>
3. Melik-Kasumov T. B., Pavlyut' T. O., Zhavoronok I. P., Antipova O. A., Pekhtereva E. I., Vasil'kevich A. I., Kisel' M. A., Molchanova A. Yu. Assessment of antinociceptive effects of palmitic acid amides. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2016, no. 4, pp. 25–31 (in Russian).
4. Sanitary rules and norms 2.1.2.12–18–2006 «Device, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums)»: approved by the Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus, No. 131, October 31, 2006. (in Russian).
5. Veterinary-sanitary rules for receiving, care and opening of experimental animals in vivariums of research institutes, stations, laboratories, educational institutions, and also in nurseries: approved by the Resolution of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus, N 36, May 21, 2010: with amendments and additions dated October 26, 2016, N 63. *Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus*. Available at: <https://mshp.gov.by/documents/technical-acts/cb5d27ea51a49bea.html> (accessed 07.04.2019) (in Russian).
6. State Standard 33044-2014. *Principles of good laboratory practice*. Moscow, Standartinform Publ., 2015. 16 p. (in Russian).
7. Mironov A. N. (ed.). *A guide to preclinical drug research. Pt. 1*. Moscow, Grif i K Publ., 2012. 944 p. (in Russian).
8. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes, n 123 of 18 march 1986; protocol of amendment to the european convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. Strasbourg, 22 June 1998. 48 p.
9. Abrashova T. V., Gushchin Ya. A., Kovaleva M. A., Rybakova A. V., Selezneva A. I., Sokolova A. P., Khod'ko S. V. *Physiological, biochemical and biometric indicators of the rate of experimental animals*. Saint Petersburg, Lema Publ., 2013. 116 p. (in Russian).

## Информация об авторах

*Антипова Ольга Александровна* – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mayuha@yandex.ru

*Жаворонок Ирина Петровна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: iri8308@yandex.ru

*Павлють Татьяна Олеговна* – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tanja281286@mail.ru

*Пехтерева Елена Ивановна* – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: eleivatar@list.ru

*Мелик-Касумов Тигран Бегларович* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tigranbmk@gmail.com

*Кодаленкова Светлана Александровна* – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: masyaka00@mail.ru

*Михальчук Александр Леонидович* – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, зам. заведующего лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lipmal@iboch.bas-net.by

*Кисель Михаил Александрович* – д-р хим. наук, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси.

*Молчанова Алла Юрьевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alla@fizio.bas-net.by

## Information about the authors

*Olga A. Antipova* – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mayuha@yandex.ru

*Irina P. Zhavoronok* – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: iri8308@yandex.ru

*Tatjana O. Pavlut* – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tanja281286@mail.ru

*Elena I. Pehtereva* – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: eleivatar@list.ru

*Tigran B. Melik-Kasumov* – Ph. D. (Biol.), Leading researcher, Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tigranbmk@gmail.com

*Svetlana A. Kodalenkova* – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: masyaka00@mail.ru

*Aleksandr L. Mihal'chuk* – Ph. D. (Chem.), Leading researcher, Deputy Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lipmal@iboch.bas-net.by

*Mihail A. Kisel* – D. Sc. (Chem.), Head of the Laboratory.

*Alla Y. Molchanova* – Ph. D. (Biol.), Senior researcher, Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alla@fizio.bas-net.by

С. Х. Домбаян, И. В. Панова, Г. М. Летифов<sup>1</sup>

*Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

## НЕЙРОНСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЕНОЛАЗА КРОВИ У ДЕТЕЙ С *HELICOBACTER PYLORI*-АССОЦИИРОВАННЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРОДУОДЕНИТОМ

**Аннотация.** Цель исследования – оценить уровень нейронспецифической енолазы (НСЕ) в крови детей с хроническим гастродуоденитом (ХГД) в зависимости от наличия *Helicobacter pylori* (НР) инфекции, тяжести воспалительного процесса, половой принадлежности.

В исследовании приняли участие 73 ребенка с ХГД. В I группу вошли дети с ХГД, ассоциированным с НР (ХГД НР+); во II – дети с ХГД, не ассоциированным с НР (ХГД НР–); в группу контроля (ГК) – 28 детей с I–II группой здоровья. Для диагностики заболевания использовали эндоскопические, морфологические методы; для верификации НР – уреазный, бактериоскопический, молекулярно-биологические и серологические тесты.

Выявлены повышенные уровни НСЕ у детей как I, так и II группы в сравнении с ГК ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$ ). В сыворотке крови мальчиков с ХГД НР+ отмечались более высокие показатели НСЕ, чем у девочек с ХГД НР+ ( $p < 0,01$ ). Аналогичные изменения, связанные с гендерным фактором, выявлены во II группе ( $p < 0,01$ ). В I группе наибольшие значения НСЕ отмечались при эрозивном гастродуодените ( $p < 0,01$ ), в то время как во II группе направленность изменений значения фермента носила противоположный характер и зависела от тяжести заболевания.

Возрастание уровня НСЕ в сыворотке крови детей как с ХГД НР+, так и с ХГД НР– указывает на участие фермента в механизмах воспалительного процесса в слизистой оболочке (СО) гастродуоденальной области вне зависимости от НР-инфекции. Разнонаправленный характер изменения НСЕ в зависимости от особенностей поражения СО гастродуоденальной зоны в I и II группах не исключает причастность НСЕ к механизмам формирования тяжести заболевания. Более высокие уровни НСЕ у мальчиков как при ХГД НР+, так и при ХГД НР– не исключают взаимосвязи между уровнем НСЕ и функциями половых гормонов.

**Ключевые слова:** нейронспецифическая енолаза, хронический гастродуоденит, *Helicobacter pylori* инфекция, девочки, мальчики

**Для цитирования:** Домбаян, С. Х. Нейронспецифическая енолаза крови у детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным хроническим гастродуоденитом / С. Х. Домбаян, И. В. Панова, Г. М. Летифов // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 151–155. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-151-155>

S. Kh. Dombayan, I. V. Panova, G. M. Letifov

*Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation*

## NEURON-SPECIFIC BLOOD ENOLASE IN CHILDREN WITH *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED CHRONIC GASTRODUODENITIS

**Abstract.** The aim of the study was to assess the level of blood neuron specific enolase (NSE) in children with chronic gastroduodenitis (CGD) depending on *Helicobacter pylori* (HP), the severity of the inflammatory process, sex.

The study involved 73 children with CGD. Group I – children with CGD associated with HP (HP CGD+); group II – with CGD not associated with HP (CGD, HP–). The control group (GK) – 28 healthy children. In the diagnosis of the disease, the endoscopic and morphological methods were used; the urease, microscopy, molecular biological and serological tests were performed to verify HP.

The elevated levels of NSE were revealed in children groups I and II compared with GK ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ). High levels of NSE in serum were observed in boys with CGD HP+ compared with girls with CGD HP+ ( $p < 0.01$ ). Similar changes related to the gender were identified in group II ( $p < 0.01$ ). In group I the highest values of NSE were identified with erosive gastroduodenitis ( $p < 0.01$ ). In group II the opposite direction of enzyme changes was revealed and depended on the severity of the disease.

The increase of NSE in the blood of children with CGD HP+ and HP– indicates the presence of enzyme in the mechanisms of the inflammatory process in the mucous membrane gastroduodenal area outside the continuum of HP-infection. A multi-directional character of NSE changes depending on the characteristics of lesions mucous membrane gastroduodenal zone in

groups I and II does not exclude the NSE involvement into the mechanisms of formation of the severity of the disease. Higher levels of NSE in boys as in CGD, HP+ and HP – do not exclude the relations of NSE and sex hormones.

**Keywords:** neuron specific enolase, chronic gastroduodenitis, *Helicobacter pylori* infection, girls, boys

**For citation:** Dombayan S. Kh., Panova I. V., Letifov G. M. Neuron-specific blood enolase in children with *Helicobacter pylori*-associated chronic gastroduodenitis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 151–155 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-151-155>

**Введение.** В настоящее время болезни органов пищеварения занимают второе место в структуре хронических заболеваний детей и подростков. Основную проблему по-прежнему представляют хронические гастродуодениты, на долю которых приходится 70–75 % от всех заболеваний верхних отделов пищеварительного тракта (ВОПТ) [1].

Формирование хронического воспалительного процесса в слизистой оболочке (СО) ВОПТ обусловлено многообразием этиологических факторов и патогенетических механизмов. В качестве одного из основных триггеров, инициирующих развитие хронической гастродуоденальной патологии, выступает *Helicobacter pylori* (НР) инфекция. В 80–83 % случаев хронический гастродуоденит (ХГД) у детей имеет инфекционную этиологию [2, 3]. Установлена также патогенетическая роль дисфункции нейрогормональной регуляции в патогенезе ХГД [3, 4].

В последнее время все больше внимания уделяется лабораторной диагностике, включающей определение уровня нейронспецифической енолазы (НСЕ) как основного внутриклеточного фермента центральной нервной системы [5]. В фундаментальных работах отмечено, что НСЕ обнаруживается во всех тканях и органах человека, в том числе в тканях желудочно-кишечного тракта, при этом особенно активен данный фермент в сыворотке крови [6, 7].

Таким образом, представляется целесообразным исследование особенностей изменения уровня НСЕ в сыворотке крови детей, которые страдают ХГД, ассоциированным с НР-инфекцией.

Цель исследования – оценить изменение уровня нейронспецифической енолазы у детей с хроническим гастродуоденитом в зависимости от наличия *Helicobacter pylori*, тяжести воспалительных изменений слизистой оболочки верхних отделов пищеварительного тракта и половой принадлежности.

**Объекты и методы исследования.** В исследование было включено 73 ребенка в возрасте 8–15 лет с ХГД, из них 34 (46,6 %) девочки и 39 (53,4 %) мальчиков. В I группу вошли 30 (41,1 %) детей с ХГД, ассоциированным с НР (ХГД НР+), во II – 43 (58,9 %) ребенка с ХГД, не ассоциированным с НР (ХГД НР–).

В I группу было включено 14 (46,7 %) детей с поверхностным гастродуоденитом (ПГД) и 16 (53,3 %) с эрозивным гастродуоденитом (ЭГД), во II группу – 27 (62,8 %) детей с ПГД и 16 (37,2 %) с ЭГД.

Соотношение мальчиков и девочек в I группе составило 60 и 40 % ( $n = 18$  и  $n = 12$  соответственно), во II группе – 48,8 и 51,2 % ( $n = 21$  и  $n = 22$  соответственно).

Группу контроля (ГК) составили 28 детей с I–II группой здоровья в возрасте 8–15 лет, из них 17 (60,7 %) мальчиков и 11 (39,3 %) девочек.

Пациентов включали в исследование после получения информированного согласия родителей и подростков.

Диагноз хронической воспалительной патологии ВОПТ устанавливали на основании жалоб, данных анамнеза, результатов общеклинического и инструментального обследования. Всем детям проводилось эндоскопическое исследование, в том числе с применением НВИ-технологий, гистологическое исследование.

Уровень НСЕ в сыворотке крови пациентов определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя наборы фирмы Can Ag Diagnostics (Швеция) в стандартизированных условиях, утром натощак. Результаты ИФА регистрировали и оценивали с помощью фотометра SUNRISE производства TECAN (Австрия).

Для диагностики НР-инфекции у всех пациентов использовали три метода: бактериоскопический метод в препаратах биоптатов СО антрального и фундального отделов желудка; полимеразную цепную реакцию для детекции ДНК *Helicobacter pylori* в биоптатах СО антрального

отдела желудка тест-системами «Литекс» (Россия); уреазный метод – определение уреазной активности в биоптате СО желудка путем помещения его в жидкую среду, содержащую стандартный RU-тест *Helicobacter pylori* (Россия); иммуноферментный анализ сыворотки крови на наличие иммуноглобулинов класса А и суммарных иммуноглобулинов к *Helicobacter pylori* с помощью тест-систем DRG (Германия).

Для статистической обработки результатов исследования использовали пакеты программы Statistica for Windows (версия 6.1) и методы непараметрической статистики (критерий Манна–Уитни), принимая во внимание, что распределение значений НСЕ не соответствует закону нормального распределения. Данные представлены в виде медианы (Me), а также 25-го и 75-го квартиля [25 %–75 %]. Достоверным считали уровень значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Исследование показало, что уровень НСЕ у детей I и II групп превышал значения НСЕ в группе контроля: 10,9 (9,9–12,3); 11,2 (10,0–12,2) и 9,8 (8,5–10,9) мкг/л соответственно ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$ ). При этом значимых различий между показателями детей I и II групп не выявлено ( $p > 0,05$ ) (табл. 1). Полученные данные дают основание предположить отсутствие взаимосвязи между изменением уровней НСЕ и наличием НР-инфекции в патогенезе ХГД.

Таблица 1. Уровень нейронспецифической енолазы в сыворотке крови у детей с хроническим гастродуоденитом I и II групп (Me [25 %–75 %])

Table 1. Level of neuron-specific enolase in the serum of children with chronic gastroduodenitis in groups I and II (Me [25 %–75 %])

Показатель	ГК (n = 28)	I группа (n = 30)	II группа (n = 43)
НСЕ, мкг/л	9,8 [8,5–10,9]	11,2 [10,0–12,2]	10,9 [9,7–12,3]

Примечание. Достоверность различий между группами ГК и I, ГК и II при  $p < 0,01$ ; между группами I и II при  $p < 0,05$ .

Установлено, что в I группе уровень изучаемого фермента при ЭГД НР+ превышает значения НСЕ у детей с ПГД НР+ и в ГК: 12,1 (11,2–12,3); 10,1 (10,0–11,4) и 9,8 (8,5–10,9) мкг соответственно ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$ ). Полученный результат указывает на формирование маркерного эффекта НСЕ при утяжелении воспалительного процесса в гастродуоденальной области. Что касается динамики НСЕ во II группе, следует отметить другую направленность изменений уровня фермента при ПГД НР–: 11,1 (10,5–12,3) мкг/л в сравнении с ЭГД НР–: 10,5 (9,5–10,6) мкг/л,  $p < 0,01$ . Причем значения НСЕ у этих детей, так же как и в I группе, превышали контрольные показатели (табл. 2).

Уровень НСЕ в сыворотке крови у больных с ЭГД НР+ существенно превышал значения показателя при ЭГД НР–: 12,1 (11,2–12,3) и 10,5 (9,5–10,6) мкг/л соответственно,  $p < 0,01$ . Альтернативный характер изменений уровня НСЕ выявлен у больных с ПГД, т. е. обнаружены более высокие значения НСЕ у детей с ПГД НР– в сравнении с ПГД НР+: 11,1 (10,5–12,3) и 10,1 (10,0–11,4) мкг/л соответственно,  $p < 0,05$ . Полученные данные не исключают возможности избирательного участия НСЕ в сложных механизмах формирования различной степени тяжести воспалительного процесса в СО ВОПТ с учетом эффектов НР (табл. 2).

Таблица 2. Концентрация нейронспецифической енолазы сыворотки крови у детей с хроническим гастродуоденитом I и II групп с учетом степени выраженности воспалительного процесса

Table 2. Concentration of serum neuron-specific enolase in children with chronic gastroduodenitis Groups I and II taking into account the severity inflammatory process (Me [25 %–75 %])

Показатель	ГК (n = 28)	I группа		II группа	
		ПГД НР+ (n = 14)	ЭГД НР+ (n = 16)	ПГД НР– (n = 27)	ЭГД НР– (n = 16)
НСЕ, мкг/л	9,8 [8,5–10,9]	10,1 [10,0–11,4]	12,1 [11,2–12,3]	11,1 [10,5–12,3]	10,5 [9,5–10,6]

Примечание. Группы: I – пациенты с ХГД НР+, II – пациенты с ХГД НР–. Достоверность различий между группами ГК и ЭГД НР+, ГК и ПГД НР– при  $p < 0,01$ ; между группами ГК и ПГД НР+ при  $p < 0,05$ .

Анализ результатов в зависимости от половой принадлежности показал, что у мальчиков I группы уровень НСЕ в сыворотке крови значимо выше, чем у девочек I группы: 12,0 (10,2–12,3) и 10,1 (9,9–10,6) мкг/л соответственно,  $p < 0,01$ . Аналогичные изменения были выявлены и у пациентов с ХГД НР–: 12,2 (10,9–12,9) и 10,4 (9,3–10,8) мкг/л у мальчиков и девочек соответственно,  $p < 0,01$ . Данное обстоятельство не исключает взаимосвязи между уровнем НСЕ и функцией половых гормонов (табл. 3). Причем уровень НСЕ как у мальчиков, так и у девочек существенно превышал контрольные значения показателя в обеих группах, что не противоречит предположению о взаимосвязи между уровнем НСЕ и патогенетическими механизмами ХГД. Не выявлено различий концентраций НСЕ у мальчиков и девочек I группы в сравнении с таковыми в группе II ( $p > 0,05$ ), что указывает на низкую степень ассоциации НСЕ с НР-инфекцией в генезе ХГД.

Т а б л и ц а 3. Концентрация нейронспецифической енолазы сыворотки крови у детей с хроническим гастродуоденитом с учетом половой принадлежности

Table 3. Concentration of serum neuron-specific enolase in children with chronic gastroduodenitis, taking into account the gender (Me [25 %–75 %])

Показатель	Девочки			Мальчики		
	ГК (n = 11)	I группа (n = 12)	II группа (n = 22)	ГК (n = 17)	I группа (n = 18)	II группа (n = 21)
НСЕ, мкг/л	9,0 [7,8–10,0]	10,1 [9,9–10,6]	10,4 [9,3–10,8]	9,7 [9,0–11,2]	12,0 [10,2–12,3]	12,2 [10,9–12,9]

П р и м е ч а н и е. Группы: I – пациенты с ХГД НР+, II – пациенты с ХГД НР–. Достоверность различий между группами ГК и ХГД НР+, ГК и ХГД НР– при  $p < 0,05$ ; между группами ГК и ХГД НР+, ГК и ХГД НР– при  $p < 0,01$ .

### Выводы

1. Возрастание у детей как с ХГД НР+, так и с ХГД НР– уровня НСЕ в сыворотке крови в сравнении с контролем указывает на возможное участие НСЕ в сложных механизмах развития воспалительных процессов в слизистой оболочке ВОПТ независимо от патогенных эффектов *Helicobacter pylori*.

2. Разнонаправленный характер изменений НСЕ в сыворотке крови в зависимости от характера поражения СО ВОПТ в I и II группах не исключает вероятности причастности изучаемого фермента к механизмам, определяющим формирование различной степени тяжести заболевания.

3. Выявленные более высокие показатели НСЕ в сыворотке крови у мальчиков в сравнении с девочками как при ХГД НР+, так и при ХГД НР– могут свидетельствовать о возможной взаимосвязи между уровнем НСЕ и определенными функциями половых гормонов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список использованных источников

1. Диагностика и лечение *Helicobacter pylori*-ассоциированных гастродуоденальных заболеваний у детей в рекомендациях международных и национальных согласительных документов / Е. М. Никифорова [и др.] // Лекарств. вестн. – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 31–35.
2. Файзуллина, Р. А. Характеристика методов выявления *Helicobacter pylori* у детей с хронической гастродуоденальной патологией / Р. А. Файзуллина, Е. В. Абдуллина, И. И. Ахметов // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9, № 3-2. – С. 312–315.
3. Зрячкин, Н. И. Хронический гастрит и гастродуоденит у детей дошкольного и школьного возраста (1-я часть) / Н. И. Зрячкин, Г. И. Чеботарева, Т. Н. Бучкова // Вопр. детской диетологии. – 2015. – Т. 13, № 4. – С. 46–51.
4. Панова, И. В. Динамика оксида азота и эндотелина-1 в зависимости от стадий полового развития и особенностей вегетативного статуса у детей с хроническими воспалительными заболеваниями верхних отделов пищеварительного тракта / И. В. Панова // Врач-аспирант. – 2012. – Т. 55, № 6.1. – С. 241–248.
5. Домбаян, С. Х. Особенности изменения уровня нейронспецифической енолазы у детей I–II группы здоровья в зависимости от показателей физического развития и пола / С. Х. Домбаян, И. В. Панова // Врач-аспирант. – 2016. – Т. 75, № 2.2. – С. 273–278.

6. Нейрохимия / И. П. Ашмарин [и др.] ; под ред. И. П. Ашмарина, П. В. Стукалова. – М. : Изд-во Ин-та биомед. химии РАМН, 1996. – 470 с.

7. Вилкинсон, Д. Принципы и методы диагностической энзимологии / Д. М. Вилкинсон ; пер. с англ. К. Г. Овчинникова, И. Д. Стальной. – М. : Медицина, 1981. – 624 с.

## References

1. Nikiforova E. M., Polyakova O. V., Smykova S. V., Petrova I. V., Malyuzhinskaya N. V. Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease in children recommendations of international and national consensus documents. *Lekarstvennyi vestnik* [Medical herald], 2015, vol. 9, no. 1, pp. 31–35 (in Russian).

2. Faizullina R. A., Abdullina E. V., Akhmetov I. I. Description of methods for the detection of *Helicobacter pylori* in children with chronic gastroduodenal pathology. *Geny i kletki* [Genes and cells], 2014, vol. 9, no. 3-2, pp. 312–315 (in Russian).

3. Zryachkin N. I., Chebotareva G. I., Buchkova T. N. Chronic gastritis and gastroduodenitis in preschool and school children (pt. 1). *Voprosy detskoj dietologii* [Children's nutrition issues], 2015, vol. 13, no. 4, pp. 46–51 (in Russian).

4. Panova I. V. Dynamics of nitric oxide and endothelin-1, depending on the stages of sexual development and characteristics of vegetative status in children with chronic inflammatory diseases of the upper digestive tract. *Vrach-aspirant* [Doctor-graduate student], 2012, vol. 55, no. 6.1, pp. 241–248 (in Russian).

5. Dombayan S. Kh., Panova I. V. Peculiarities of changes in the of neuron specific enolase the level children of I–II groups of health depending on the indexes of physical development and sex. *Vrach-aspirant* [Doctor-graduate student], 2016, vol. 75, no. 2.2, pp. 273–278 (in Russian).

6. Ashmarin I. P., Antipenko A. E., Ashapkin V. V. [et al.]. *Neurochemistry*. Moscow, Publishing House of the Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences, 1996. 470 p. (in Russian).

7. Wilkinson J. H. *Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*. London, Hodder and Stoughton Educational. 608 p. (Russ. ed.: Vilkinson, D. *Printsipy i metody diagnosticheskoi enzimologii*. Moscow, Meditsina Publ., 1981. 624 p.).

## Информация об авторах

Домбаян Светлана Христофоровна – канд. мед. наук, доцент. Ростовский государственный медицинский университет (пер. Нахичеванский, 29, 344022, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: svetmed@yandex.ru

Панова Ирина Витальевна – д-р мед. наук, профессор, доцент. Ростовский государственный медицинский университет (пер. Нахичеванский, 29, 344022, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: pan\_tol@list.ru

Летифов Гаджи Муталибович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Ростовский государственный медицинский университет (пер. Нахичеванский, 29, 344022, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: gmletifov@yandex.ru

## Information about the authors

Svetlana Kh. Dombayan – Ph. D. (Med.), Assistant professor. Rostov State Medical University (29, Nakhichevansky Str., 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation). E-mail: svetmed@yandex.ru

Irina V. Panova – D. Sc. (Med.), Professor, Assistant professor. Rostov State Medical University (29, Nakhichevansky Str., 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation). E-mail: pan\_tol@list.ru

Gadzhı M. Letifov – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Rostov State Medical University (29, Nakhichevansky Str., 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation). E-mail: gmletifov@yandex.ru

А. С. Королько<sup>1</sup>, В. В. Сушевич<sup>2</sup>, Я. И. Евко<sup>2</sup>, О. П. Кезля<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Многопрофильная медицинская компания «ЛЮДЭ», Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Минская областная клиническая больница, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

## ПОПУЛЯЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С КОКСАРТРОЗОМ

**Аннотация.** Обследовано 150 пациентов со II–III стадией развития артроза тазобедренных суставов (по Келлгрэн–Лоуренсу). Проведена статистическая обработка результатов обследования и на популяционном уровне выявлены факторы, способствующие развитию коксартроза и влияющие на обращаемость пациентов в лечебное учреждение.

**Ключевые слова:** коксартроз, факторы риска, индекс массы тела

**Для цитирования:** Популяционная характеристика пациентов с коксартрозом / А. С. Королько [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 156–165. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-156-165>

A. S. Korolko<sup>1</sup>, V. V. Sushevich<sup>2</sup>, Ya. I. Evko<sup>2</sup>, O. P. Kezlya<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Multi-field Medical Company “LODE”, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Minsk Regional Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

## POPULATION CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH COXARTHROSIS

**Abstract.** We examined 150 patients with osteoarthritis of hip joints. The stage of development of arthrosis is II–III (according to Kellgren–Lawrence). Statistical processing was carried out, and the risk factors at the population level were revealed, which provide the emergence of coxarthrosis and affect the patient's circulation.

**Keywords:** coxarthrosis, risk factors, body mass index

**For citation:** Korolko A. S., Sushevich V. V., Evko Ya. I., Kezlya O. P. Population characteristics of patients with coxarthrosis. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 156–165 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-156-165>

**Введение.** Коксартроз – дегенеративно-дистрофическое заболевание тазобедренного сустава, характеризующееся выраженным болевым суставным синдромом и ограничением движений в нем, вызванных деградацией суставного хряща. Поражаются все компоненты сустава: субхондральная кость, хрящ, связочный аппарат, синовиальная оболочка, капсула и периапартулярные ткани. Развивающийся при этом каскад воспалительных событий ведет к прогрессирующему тотальному нарушению анатомии тазобедренного сустава и его функций [1, 2].

Ежегодный рост распространенности ортопедических заболеваний в развитых странах мира отрицательно влияет на показатели состояния здоровья населения (увеличивается доля лиц с временной и стойкой утратой трудоспособности и инвалидностью). При этом заболеваемость болезнями костно-мышечной системы в течение последнего десятилетия прогрессирует во всех возрастных группах [3].

Среди заболеваний костно-мышечной системы наиболее широко распространенной патологией синовиальных суставов является остеоартроз [4].

Ежегодно в Беларуси регистрируется более 30 тыс. заболеваний артрозами взрослого населения. В последние годы первичная заболеваемость колебалась от 281,8 (2002 г.) до 489,0 (2008 г.) случая на 100 000 (в 2011 г. – 455,1 случая на 100 тыс. взрослого населения). Общая заболеваемость

мость за этот период выросла более чем в 2 раза – от 1258,1 до 2752,8 случая на 100 000. Если среднегодовой темп прироста ( $T_{cp}$ ) первичной заболеваемости артрозами за 10 лет составил 4,1 % и в течение последних 6 лет сохраняется на одном уровне, то общее число пациентов постоянно увеличивается, как и показатель общей заболеваемости ( $T_{cp} = 8,2 \%$ ) [5].

Согласно результатам проведенных исследований, потребность в эндопротезировании крупных суставов в республике будет неуклонно возрастать. В настоящее время на диспансерном учете в организациях здравоохранения состоит более 43 тыс. пациентов с различными видами артрозов, и каждый 3–4-й из них, т. е. более 10 тыс. человек, нуждается в эндопротезировании. Болезни костно-мышечной системы занимают третье место среди причин утраты трудоспособности (8,6 %). При этом в структуре заболеваний костно-мышечной системы на артрозы крупных суставов (коленного, тазобедренного) приходится 25,5 %. В 2016 г. в Беларуси было выполнено 5643 операций по эндопротезированию тазобедренного сустава и 1470 – коленного [6].

Увеличение числа пациентов с коксартрозом представляет серьезную медико-социальную проблему. Заболеваемость данной патологией в России составляет 17,8–20,0 случая на 10 000 взрослого населения. В различных странах Европы и США частота поражения тазобедренного сустава колеблется в пределах 7,0–88,0 случая на 10 000 населения. В последние годы в РФ ввиду снижения возрастного порога лиц с данной патологией и увеличения доли лиц пожилого и старческого возраста отмечается более чем 10,0 %-ный прирост заболеваемости коксартрозом [7, 8].

Этиология коксартроза многофакторная и может рассматриваться как процесс взаимодействия между системными и локальными факторами. К системным факторам риска коксартроза относят: возраст старше 45–50 лет, гендерный и гормональный факторы, метаболический синдром, наследственность и расовую принадлежность, питание; к местным факторам – избыточную массу тела и ожирение, последствия травм и оперативных вмешательств, тяжелые условия труда, чрезмерную физическую активность, а также биомеханические факторы – нарушение оси конечности, гипермобильность суставов, статические деформации и др. [2, 9, 10].

В 80,0 % случаев коксартроз носит вторичный характер. Он развивается при дисплазиях, юношеском эпифизеолизе головки бедра, болезни Пертеса, при некрозе головки бедра, вызванном различными причинами. Некроз головки бедра может быть следствием глубоководного погружения, сосудистых нарушений в головке бедра, метаболических нарушений, глюкокортикоидной терапии, действия алкоголя или врожденных пороков развития [9]. Накопленный клинический опыт свидетельствует о том, что традиционные консервативные методы лечения коксартроза малоэффективны, а хирургическое лечение, выполняемое в терминальной стадии заболевания, является дорогостоящим и не всегда осуществимо в рекомендуемый период. В связи с этим в последнее десятилетие все более интенсивно разрабатываются и внедряются в практику инновационные методы профилактики и лечения коксартроза, в частности применение препаратов гиалуроновой кислоты для локальной инъекционной терапии в тазобедренный сустав [11, 12].

Новые исследования в молекулярной биологии и биологической фармакологии подтверждают эффективность применения препаратов гиалуроновой кислоты для локальной инъекционной терапии в тазобедренный сустав как жизнеспособный вариант лечения коксартроза. Ряд авторов рекомендуют его в качестве превентивного консервативного метода лечения коксартроза, прежде чем предлагать пациентам операцию эндопротезирования сустава [12–14]. Несмотря на широкий спектр имеющихся препаратов и используемых манипуляций, лечение коксартроза остается сложной задачей, решение которой требует комплексного подхода.

Цель работы – выявить факторы, которые способствуют развитию коксартроза и влияют на обращаемость пациентов в лечебное учреждение.

**Материалы и методы исследования.** Проведен анализ факторов риска, которые способствуют развитию коксартроза и влияют на обращаемость пациентов в лечебное учреждение, у 150 пациентов с идиопатическим коксартрозом (50 (33 %) мужчин и 100 (66,7 %) женщин), находившихся на амбулаторном лечении в Минской областной клинической больнице в 2017–2018 гг.

Важнейшей частью статистического анализа являлась характеристика рядов распределения (структурной группировки) с целью выделения характерных свойств и закономерностей изучаемой совокупности.

*Характеристика возрастных особенностей изучаемой популяции.* Возраст человека делится на возрастные периоды, на протяжении которых совершаются определенные морфологические и функциональные сдвиги в отдельных тканях, органах и всем организме. С медицинской и социологической точки зрения на данный момент в Беларуси выделяют следующие возрастные группы: младше трудоспособного возраста – до 18 лет; трудоспособное население – мужчины в возрасте от 18 лет до 60 лет 6 мес.; женщины в возрасте от 18 лет до 55 лет 6 мес.; старше трудоспособного возраста – мужчины в возрасте 60 лет 6 мес. и старше и женщины в возрасте 55 лет 6 мес. и старше.

В исследование были включены женщины от 29 лет до 83 лет ( $M_o = 61$ ,  $M_e = 61,5$ ,  $X_{cp} = 60,66$ , нормальное симметричное распределение признака), мужчины от 35 лет до 76 лет ( $M_o = 63$ ,  $M_e = 57,5$ ,  $X_{cp} = 57,13$ , нормальное распределение признака, с левосторонним уклоном).

Таким образом, средний возраст дебюта заболевания приходился на  $58,9 \pm 1,9$  года. Среди мужчин наиболее часто заболеваемость регистрировали в возрасте 61 год (минимальный возраст 35 лет), среди женщин – в 63 года (минимальный возраст 29 лет).

Т а б л и ц а 1. Структура распределения пациентов по возрастным группам

T a b l e 1. Structure of the distribution of patients by age groups

Возрастная группа	Мужчины		Женщины		Итого	
	Абс. ч.	Уд. вес	Абс. ч.	Уд. вес	Абс. ч.	Уд. вес
Младше трудоспособного возраста	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Трудоспособное население	27	54,0	28	28,0	55	36,7
Старше трудоспособного возраста	23	46,0	72	72,0	95	63,3
Всего	50	100,0	100	100,0	150	100,0

Возрастная группа «старше трудоспособного возраста» включала  $63,3 \pm 3,9$  % пациентов от общего числа изучаемой популяции (табл. 1). Удельный вес трудоспособного населения составил  $36,7 \pm 3,9$  % пациентов, т. е. показатель «старше трудоспособного возраста» может быть определен как фактор риска развития коксартроза ( $d = 26,6 \pm 5,5$  %,  $p < 0,05$ ). Однако широкий разброс случаев заболеваемости коксартрозом по возрастам (от 29 лет до 83 лет) подтверждает известный факт о наличии тенденции к омоложению заболеваемости коксартрозом.

*Однородность рядов по возрасту пациентов.* Показатели центральной тенденции (средние величины  $M_o$ ,  $M_e$ ), которые являются равнодействующими ряда изменяющихся значений признака, не всегда дают исчерпывающие характеристики изучаемой популяции. Возникает необходимость изучения характера рассеивания признака, формирующего среднюю величину, так как высока роль индивидуальных причин, которые могут формировать аномальные, нетипичные для изучаемой когорты признаки ( $t > 3$ ).

Для оценки однородности совокупности используют различные методы, такие как группировка, расчет показателей вариации (дисперсия, коэффициент вариации), анализ аномальных наблюдений на основе  $q$ -статистик.

Для определения однородности популяции нами использована формула  $Q = (X_2 - X_1)/(X_n - X_1)$  для первого в ряду значения признака и  $Q = (X_n - X_{n-1})/(X_n - X_1)$  для последнего в ряду значения признака.

Рассчитанный коэффициент  $Q$  сравнивали с табличным значением («Критерии для исключения «выскакивающих вариантов»») для данного числа наблюдений ( $n$ ) и уровня вероятности ( $p < 0,05$ ). Если  $Q_{ф} > Q_{табл}$ , то показатель подлежал исключению из дальнейшей обработки данных. Если  $Q_{ф} < Q_{табл}$ , то значение не исключали и, следовательно, вариационный ряд считали однородным.

Для женской популяции:  $Q_{\max} = 0,037$  ( $Q_{\text{табл}} = 0,260$ );  $Q_{\min} = 0,019$  ( $Q_{\text{табл}} = 0,260$ ), следовательно, данные варианты относятся к однородному вариационному ряду.

Для мужской совокупности:  $Q_{\max} = 0,049$  ( $Q_{\text{табл}} = 0,260$ );  $Q_{\min} = 0,024$  ( $Q_{\text{табл}} = 0,260$ ), следовательно, данные варианты относятся к однородному вариационному ряду.

Таким образом, исследованная популяция пациентов не имела значимых отклонений в показателях («выскакивающих» вариант) по возрасту, которые могли бы привести к появлению аномальных признаков, искажающих общие характеристики совокупности.

*Индекс массы тела как фактор риска развития коксартроза.* О том, что коксартроз представляет собой важную социально-медицинскую проблему, значение которой возрастает в связи с повышением его распространенности, в том числе и за счет частоты ожирения (метаболического синдрома), характеризующейся индексом массы тела (ИМТ), упоминалось выше.

Для оценки изучаемой популяции по ИМТ использовали Клиническую классификацию значений ИМТ, разработанную Национальным институтом здоровья США и одобренную ВОЗ [15, 16] (табл. 2). Данный показатель рассчитывали по формуле  $I = m/h^2$  (где  $m$  – масса тела, кг;  $h$  – рост, м) и выражали в кг/м<sup>2</sup>.

Т а б л и ц а 2. Классификация ожирения (ВОЗ, 1997)

T a b l e 2. Classification of obesity (WHO, 1997)

Тип массы тела	ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	Риск сопутствующих заболеваний
Дефицит массы тела	<18,5	Низкий
Нормальная масса тела	18,5–24,9	Обычный
Избыточная масса тела	25,0–29,9	Повышенный
Ожирение I стадии	<30,0–34,9	Высокий
Ожирение II стадии	<35,0–39,9	Очень высокий
Ожирение III стадии	>40	Чрезвычайно высокий

В изучаемой популяции значения ИМТ варьировались от нормы до уровня «ожирение III стадии». У женщин ИМТ составлял от 20,0 до 56,0 кг/м<sup>2</sup> ( $M_o = 29$ ,  $M_e = 29,0$ ,  $X_{\text{cp}} = 30,9$ ), у мужчин – от 23 до 44 кг/м<sup>2</sup> ( $M_o = 29$ ,  $M_e = 28,5$ ,  $X_{\text{cp}} = 28,7$ ) (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. ИМТ изучаемой популяции

T a b l e 3. BMI of the studied population

ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	Соответствие между массой человека и его ростом	Мужчины	Женщины	Итого
16 и менее	Выраженный дефицит массы тела	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
18,5–24,9	Норма	5 (10,0 %)	15 (15,0 %)	20 (13,3 %)
25–29,9	Избыточная масса тела	23 (46,0 %)	36 (36,0 %)	59 (39,3 %)
30,0–34,9	Ожирение I стадии	13 (26,0 %)	21 (21,0 %)	34 (22,7 %)
35–39,9	Ожирение II стадии	6 (12,0 %)	18 (18,0 %)	24 (16,0 %)
40 и более	Ожирение III стадии	3 (6,0 %)	10 (10,0 %)	13 (8,7 %)

У большинства пациентов ( $39,3 \pm 3,9$  %,  $p < 0,05$ ) ИМТ составил 25–29,9 кг/м<sup>2</sup> («избыточная масса тела»), в том числе у женщин –  $36,0 \pm 3,9$  %, у мужчин –  $46,0 \pm 7,1$  %. Выше нормы ИМТ был у  $86,7 \pm 2,8$  % пациентов: у  $85,0 \pm 3,6$  % женщин и у  $90,0 \pm 7,0$  % мужчин. Следовательно, избыточный вес является доминирующим фактором риска развития коксартроза в изучаемой популяции.

*Анализ факторов, влияющих на обращаемость пациентов.* При распределении пациентов с диагнозом коксартроз учитывали следующие критерии: пораженность суставов (односторонний и двусторонний коксартроз); степень клинического проявления (I–III); возрастная группа (трудоспособный возраст и старше трудоспособного возраста); длительность заболевания; проявление болевого симптома; пол.

Доля пациентов с односторонним поражением (левый или правый тазобедренный сустав) составила  $49,3 \pm 4,1$  % ( $n = 74$ ) от общей численности изучаемой популяции ( $n = 150$ ) (табл. 4), в том числе у женщин –  $55,4 \pm 5,8$  % ( $n = 41$ ), у мужчин – у  $44,6 \pm 5,8$  % ( $n = 33$ ). В общей структуре преобладал коксартроз III степени ( $50,0 \pm 5,8$  %),  $p < 0,05$ .

Т а б л и ц а 4. Распределение пациентов с диагнозом односторонний коксартроз I–III степени

Table 4. Distribution of patients with a diagnosis of unilateral coxarthrosis I–III degree

Диагноз	Мужчины		Женщины		Итого	
	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес
Коксартроз I степени	7	$21,2 \pm 7,1$	4	$9,8 \pm 4,6$	11	$14,9 \pm 4,1$
Коксартроз II степени	10	$30,3 \pm 7,1$	16	$39,0 \pm 7,6$	26	$35,1 \pm 5,6$
Коксартроз III степени	16	$48,5 \pm 8,7$	21	$51,2 \pm 7,8$	37	$50,0 \pm 5,8$
Всего	33	$44,6 \pm 5,8$	41	$55,4 \pm 5,8$	74	$49,3 \pm 4,1$

Доля пациентов трудоспособного возраста (19–61 год) с диагнозом односторонний коксартроз I–III степени составила  $52,7 \pm 5,8$  % ( $n = 39$ ) (табл. 5), старше трудоспособного возраста (61 год и более) –  $47,3 \pm 5,8$  % ( $n = 35$ ) (табл. 6). В общей структуре преобладал коксартроз II ( $35,9 \pm 7,7$  %) и III ( $46,2 \pm 7,9$  %) степени ( $p < 0,05$ ).

Т а б л и ц а 5. Распределение пациентов трудоспособного возраста (19–61 год) с диагнозом односторонний коксартроз I–III степени

Table 5. Distribution of patients of working age (19–61 years) with a diagnosis of unilateral coxarthrosis I–III degree

Диагноз	Мужчины		Женщины		Итого	
	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес
Коксартроз I степени	7	$29,2 \pm 9,3$	0	$0,0 \pm 0,0$	7	$7,9 \pm 6,1$
Коксартроз II степени	6	$25,0 \pm 8,8$	8	$53,3 \pm 12,9$	14	$5,9 \pm 7,7$
Коксартроз III степени	11	$5,8 \pm 10,2$	7	$46,7 \pm 12,9$	18	$6,2 \pm 7,9$
Всего	24	$61,5 \pm 7,8$	15	$48,5 \pm 7,8$	39	$52,7 \pm 5,8$

Удельный вес пациентов группы старше трудоспособного возраста (61 год и более) с диагнозом односторонний коксартроз I–III степени составила  $52,7 \pm 5,8$  % ( $n = 39$ ) (табл. 6), в том числе у женщин –  $48,5 \pm 7,8$  % ( $n = 15$ ), у мужчин –  $61,5 \pm 7,8$  % ( $n = 24$ ); в группе старше трудоспособного возраста (61 год и более) –  $47,3 \pm 5,8$  % ( $n = 35$ ) (табл. 6), в том числе у женщин –  $74,3 \pm 7,4$  % ( $n = 26$ ), у мужчин –  $25,7 \pm 7,4$  % ( $n = 9$ ). В общей структуре преобладал коксартроз II ( $37,1 \pm 8,2$  %) и III ( $51,4 \pm 8,5$  %) степени ( $p < 0,05$ ).

Т а б л и ц а 6. Распределение пациентов старше трудоспособного возраста (61 год и более) с диагнозом односторонний коксартроз I–III степени

Table 6. Distribution of patients older than working age (61 years or more) with a diagnosis of unilateral coxarthrosis I–III degree

Диагноз	Мужчины		Женщины		Итого	
	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес
Коксартроз I степени	0	$0,0 \pm 0,0$	4	$15,4 \pm 6,9$	4	$11,4 \pm 5,4$
Коксартроз II степени	4	$44,4 \pm 16,5$	9	$34,6 \pm 9,3$	13	$37,1 \pm 8,2$
Коксартроз III степени	5	$55,6 \pm 16,5$	13	$50,0 \pm 9,6$	18	$51,4 \pm 8,5$
Всего	9	$25,7 \pm 7,4$	26	$74,3 \pm 7,4$	35	$47,3 \pm 5,8$

Доля пациентов с диагнозом двусторонний коксартроз I–III степени (левый и правый тазобедренные суставы) составила  $50,7 \pm 4,1$  % ( $n = 76$ ) от общей численности изучаемой популяции ( $n = 150$ ) (табл. 7), в том числе у женщин –  $77,6 \pm 4,8$  % ( $n = 59$ ), у мужчин –  $22,4 \pm 4,8$  % ( $n = 17$ ). В общей структуре преобладал коксартроз III степени ( $59,2 \pm 5,6$  %) ( $p < 0,05$ ).

Т а б л и ц а 7. Распределение пациентов с диагнозом двусторонний коксартроз I–III степени

T a b l e 7. Distribution of patients with a diagnosis of coxarthrosis I–III degree (bilateral)

Диагноз	Мужчины		Женщины		Итого	
	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес
Коксартроз I степени	4	23,5 ± 9,9	16	27,1 ± 5,7	20	26,3 ± 5,1
Коксартроз II степени	4	23,5 ± 9,9	7	11,9 ± 4,2	11	14,5 ± 4,0
Коксартроз III степени	9	76,5 ± 9,8	36	61,0 ± 6,3	45	59,2 ± 5,6
Всего	17	22,4 ± 4,8	59	77,6 ± 4,8	76	50,7 ± 4,1

Доля пациентов трудоспособного возраста (19–61 год) с диагнозом двусторонний коксартроз I–III степени составила  $40,8 \pm 5,6\%$  ( $n = 31$ ) (табл. 8), в том числе у женщин –  $67,7 \pm 8,4\%$  ( $n = 21$ ), у мужчин –  $32,3 \pm 8,4\%$  ( $n = 10$ ). В общей структуре преобладал коксартроз III степени ( $61,3 \pm 7,7\%$ ) ( $p < 0,05$ ). Удельный вес пациентов старше трудоспособного возраста (61 год и более) в этой группе составил  $59,2 \pm 5,6\%$  ( $n = 45$ ) (табл. 9), в том числе у женщин –  $84,4 \pm 5,4\%$  ( $n = 38$ ), у мужчин –  $15,6 \pm 5,4\%$  ( $n = 7$ ). В общей структуре преобладал коксартроз III степени  $60,0 \pm 7,3\%$  ( $p < 0,05$ ).

Т а б л и ц а 8. Распределение пациентов трудоспособного возраста (19–61 год) с диагнозом двусторонний коксартроз I–III степени

T a b l e 8. Distribution of patients of working age (19–61 year) diagnosed with coxarthrosis I–III degree (bilateral)

Диагноз	Мужчины		Женщины		Итого	
	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес
Коксартроз I степени	0	0,0 ± 0,0	8	38,1 ± 10,4	8	25,8 ± 7,9
Коксартроз II степени	4	40,0 ± 16,3	0	0,0 ± 0,0	4	12,9 ± 6,0
Коксартроз III степени	6	60,0 ± 16,3	13	61,9 ± 10,4	19	61,3 ± 7,7
Всего	10	32,3 ± 8,4	21	67,7 ± 8,4	31	40,8 ± 5,6

Т а б л и ц а 9. Распределение пациентов старше трудоспособного возраста (61 год и более) с диагнозом двусторонний коксартроз I–III степени

T a b l e 9. Distribution of patients older than working age (61 years or more) diagnosed with bilateral coxarthrosis I–III degree

Диагноз	Мужчины		Женщины		Итого	
	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес
Коксартроз I степени	3	42,9 ± 20,1	8	21,1 ± 6,6	11	24,4 ± 6,4
Коксартроз II степени	0	0,0 ± 0,0	7	18,4 ± 6,3	7	15,6 ± 5,4
Коксартроз III степени	4	57,1 ± 20,1	23	60,5 ± 7,9	27	60,0 ± 7,3
Всего	7	15,6 ± 5,4	38	84,4 ± 5,4	45	59,2 ± 5,6

При распределении пациентов по обращаемости в лечебное учреждение (количество лет от начала появления первых клинических симптомов) выявлено, что у мужчин наиболее значимым было одностороннее поражение суставов (табл. 10), у женщин – двустороннее. Достоверность различий была существенной ( $p < 0,05$ ). Полученные данные минимизируют значимость этого фактора (одно- или двустороннее поражение) для статистического анализа. Однако статистически значимо ( $p < 0,05$ ) выделяются группы: у мужчин как при одностороннем, так и при двустороннем поражении – до 1, 2 и 5 лет; у женщин при одностороннем поражении – до 2, 5 и 10 лет, что говорит о большей «терпеливости» женщин в отношении дискомфорта и снижения качества жизни. Это подтверждается и долей женщин при двустороннем поражении (от 5 лет и более) –  $40,7 \pm 6,4\%$ .

Т а б л и ц а 10. **Обращаемость пациентов с диагнозом коксартроз в зависимости от длительности заболевания**T a b l e 10. **Turnover of patients with a diagnosis of coxarthrosis depending on the duration of the disease**

Длительность заболевания, лет	Мужчины				Женщины			
	Односторонний коксартроз		Двусторонний коксартроз		Односторонний коксартроз		Двусторонний коксартроз	
	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес
1	6	18,2 ± 6,7	3	17,6 ± 9,5	4	9,8 ± 4,6	9	15,3 ± 4,7
2	9	27,3 ± 7,7	4	23,5 ± 10,6	9	21,9 ± 6,1	10	16,9 ± 4,9
3	3	9,1 ± 5,0	1	5,9 ± 5,9	4	9,8 ± 4,6	5	8,5 ± 3,6
4	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	1	2,4 ± 2,4	1	1,7 ± 1,7
5	11	33,3 ± 8,2	8	47,1 ± 12,5	15	36,6 ± 7,5	17	28,8 ± 5,9
6–10	2	6,1 ± 4,1	0	0,0 ± 0,0	7	17,1 ± 5,9	8	13,6 ± 4,5
11–15	2	6,1 ± 4,1	1	5,9 ± 5,9	1	2,4 ± 2,4	9	15,3 ± 4,7
Всего	33	66,0 ± 6,7	17	44,0 ± 6,7	41	41,0 ± 4,9	59	59,0 ± 4,9

Анализ обращаемости (табл. 11) показал, что для мужчин также характерны временные периоды до 1, 2 и 5 лет; для женщин (табл. 12) – от 1–2 до 5–15 лет.

Т а б л и ц а 11. **Обращаемость мужчин с диагнозом коксартроз I–III степени**T a b l e 11. **Turnover of men with a diagnosis of coxarthrosis I–III degree**

Длительность заболевания, лет	Мужчины с коксартрозом						Итого	
	I степень		II степень		III степень			
	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес
1	3	7,3 ± 13,4	2	14,3 ± 9,4	4	16,0 ± 7,3	9	18,0 ± 5,4
2	1	9,1 ± 9,1	4	28,6 ± 12,1	8	32,0 ± 9,5	13	26,6 ± 6,2
3	2	18,2 ± 11,6	1	7,1 ± 7,1	1	4,0 ± 4,0	4	8,0 ± 3,8
4	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
5	5	45,5 ± 15,0	7	50,0 ± 7,1	7	28,0 ± 8,9	19	38,0 ± 6,9
6–10	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	2	8,6 ± 5,4	2	4,0 ± 2,7
11–15	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	3	12,0 ± 6,6	3	6,0 ± 3,4
Всего	11	22,0 ± 5,9	14	28,0 ± 6,3	25	50,0 ± 7,1	50	33,3 ± 3,8

Высокозначимым с клинической точки зрения является степень поражения сустава и ее влияние на обращаемость. Анализ данного показателя у мужчин (табл. 11) выявил доминирование в общей структуре III степени коксартроза ( $50,0 \pm 7,1 \%$ ,  $p < 0,05$ ), т. е. каждый второй пациент обращается за медицинской помощью лишь при развитии поражения сустава, достигшего клинической III степени.

Следовательно, уровень информированности пациентов, уровень организации профилактики динамического развития коксартроза имеют низкую эффективность, что требует кардинального пересмотра принципов работы и ее организации.

Данный вывод подтверждается тем, что на популяционном уровне у женщин в общей структуре пораженности суставов также отмечается преобладание III степени ( $57,0 \pm 4,9 \%$ ,  $p < 0,05$ ), т. е. высокий уровень патологического поражения (табл. 12).

Т а б л и ц а 12. **Обрацаемость женщин с диагнозом коксартроз I–III степени**T a b l e 12. **Turnover of women with a diagnosis of coxarthrosis I–III degree**

Длительность заболевания, лет	Женщины с коксартрозом						Итого	
	I степень		II степень		III степень			
	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес	Абс. число	Уд. вес
1	1	5,0 ± 5,0	3	13,0 ± 7,0	9	15,7 ± 4,8	13	13,0 ± 3,4
2	4	20,0 ± 8,9	1	4,4 ± 4,4	14	24,6 ± 5,7	19	19,0 ± 3,9
3	2	10,0 ± 9,4	3	13,0 ± 7,0	4	7,0 ± 3,3	9	9,0 ± 2,9
4	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	2	3,5 ± 2,4	2	2,0 ± 1,4
5	7	35,6 ± 10,7	11	47,8 ± 10,4	14	24,6 ± 5,7	32	32,0 ± 4,7
6–10	4	20,0 ± 8,9	1	4,4 ± 4,4	10	17,5 ± 5,0	15	15,0 ± 3,8
11–15	2	10,0 ± 9,4	4	17,4 ± 7,9	4	7,0 ± 3,3	10	10,0 ± 3,0
Всего	20	20,0 ± 4,0	23	23,0 ± 4,2	57	57,0 ± 4,9	100	66,7 ± 3,8

Выраженность болевого синдрома по шкале ВАШ у больных коксартрозом составляла  $60,8 \pm 3,9$  мм. Между показателями ВАШ и стадиями остеоартроза не выявлено статистически значимой корреляции (коэффициент Пирсона  $\chi^2 = 0,22$ ).

У женщин показатели ВАШ были статистически более высокие ( $d = 11,6 \pm 2,4$ ,  $p < 0,05$ ), чем у мужчин:  $66,6 \pm 2,4$  и  $55,0 \pm 0,4$  мм соответственно.

### Выводы

1. Каждый второй пациент обращается за медицинской помощью лишь при развитии поражения сустава, достигшего клинической III степени: доля таких лиц среди мужчин составляет  $50,0 \pm 7,1$  % ( $p < 0,05$ ), среди женщин –  $57,0 \pm 4,9$  % ( $p < 0,05$ ).

2. Показатели удельного веса пациентов в группе трудоспособного возраста и в группе старше трудоспособного возраста не имели статистически достоверных различий ( $p < 0,05$ ) как при одностороннем, так и при двустороннем поражении суставов.

3. Избыточный вес является высокозначимым фактором риска развития коксартроза. Выше нормы вес был у  $86,7 \pm 2,8$  % пациентов, в том числе у  $85,0 \pm 3,6$  % женщин и у  $90,0 \pm 7,0$  % мужчин.

4. Выраженность болевого синдрома по шкале ВАШ у больных коксартрозом составляла  $60,8 \pm 3,9$  мм. Между показателями ВАШ и стадиями остеоартроза не выявлено статистически значимой корреляции (коэффициент Пирсона  $\chi^2 = 0,22$ ).

5. В группе женщин показатели ВАШ ( $66,6 \pm 2,4$  мм) были статистически более высокие ( $d = 11,6 \pm 2,4$ ,  $p < 0,05$ ), чем у мужчин ( $55,0 \pm 0,4$  мм).

6. Уровень информированности пациентов, уровень организации профилактики динамического развития коксартроза имеют низкую эффективность, что требует кардинального пересмотра принципов работы и ее организации.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список использованных источников

1. Краткосрочная локальная инъекционная терапия остеоартроза суставов и периартикулярных тканей глюкокортикоидами / Л. А. Сакс [и др.] // Моск. хирург. журн. – 2011. – № 3. – С. 31–35.
2. Чичасова, Н. В. Остеоартроз как общетерапевтическая проблема / Н. В. Чичасова, О. И. Мендель, Е. Л. Насонов // РМЖ. – 2010. – Т. 18, № 11. – С. 729–734.
3. Давыдов, С. О. Комплексное консервативное лечение и тотальное эндопротезирование у больных деформирующим остеоартрозом тазобедренного сустава в Забайкалье: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.22 / С. О. Давыдов; Рос. НИИ травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена. – СПб., 2003. – 42 с.
4. Маколкин, В. И. Коксартроз – вопросы этиологии, эпидемиологии, клинических проявлений и новых подходов к лечению / В. И. Маколкин, Ю. В. Пак, И. В. Меньшикова // Терапевт. архив. – 2007. – Т. 79, № 1. – С. 81–85.
5. Белецкий, А. В. Основные достижения и перспективы дальнейшего развития ортопедо-травматологической службы / А. В. Белецкий, Л. А. Пашкевич, Л. Н. Ломать // Мед. новости. – 2011. – № 7. – С. 4–10.
6. Организационные аспекты эндопротезирования крупных суставов / А. В. Белецкий [и др.] // Достижения медицинской науки: рец. науч.-практ. ежегод. / редкол.: В. И. Жарко [и др.]. – Минск, 2013. – Вып. 18. – С. 155–156.
7. Романов, Г. Н. Современные проблемы возраст-ассоциированных заболеваний: остеоартроз и остеопороз / Г. Н. Романов, Э. В. Руденко // Мед. новости. – 2012. – № 8. – С. 26–29.

8. Остеоартроз: современное состояние проблемы (аналитический обзор) / С. П. Миронов [и др.] // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. – 2001. – № 2. – С. 96–99.
9. Остеоартроз: учеб.-метод. пособие / М. А. Герасименко, А. В. Белецкий. – Минск : БГМУ, 2007. – 48 с.
10. Intra-articular treatment of osteoarthritis of the hip: a randomized study of hyaluronic acid, corticosteroid, and isotonic saline / E. R. Qvistgaard [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2006. – Vol. 14, N 2. – P. 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.09.007>
11. Intra-articular injection of hyaluronic acid (MW 1500-2000 KDa; HyalOne®) in symptomatic osteoarthritis of the hip: a prospective cohort study / A. Migliore [et al.] // *Arch. Orthop. Trauma Surg.* – 2011. – Vol. 131, N 12. – P. 1677–1685. <https://doi.org/10.1007/s00402-011-1353-y>
12. Viscosupplementation with intra-articular hyaluronic acid for treatment of osteoarthritis in the elderly / M. Abate [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2010. – Vol. 16, N 6. – P. 631–640. <https://doi.org/10.2174/138161210790883859>
13. Hylan G-F 20: review of its safety and efficacy in the management of joint pain in osteoarthritis / A. Migliore [et al.] // *Clin. Med. Insights: Arthritis Musculoskelet. Disord.* – 2010. – Vol. 3. – P. 55–68. <https://doi.org/10.1177/117954411000300001>
14. Yusuf E. Metabolic factors in osteoarthritis: obese people do not walk on their hands / E. Yusuf // *Arthritis Res. Ther.* – 2012. – Vol. 14, N 4. – P. 123. <https://doi.org/10.1186/ar3894>
15. Исследование индекса массы тела студентов Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова / А. В. Костина [и др.] // Молодой ученый. – 2018. – № 6. – С. 63–70.
16. World Health Organization (WHO). Global Database on Body Mass Index: BMI classification 2006 [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.assessmentpsychology.com/icbmi.htm>. – Date of access : 24.06.2016.

### References

1. Saks L. A., Yudin V. A., Shvetsov V. V., Trifonova N. P. Short-term local injection therapy of joint osteoarthritis and of periarticular tissues with corticosteroids. *Moskovskii khirurgicheskii zhurnal* [Moscow surgical journal], 2011, no. 3, pp. 31–35 (in Russian).
2. Chichasova N. V., Mendel' O. I., Nasonov E. L. Osteoarthrosis as a general therapeutic problem. *Russkii meditsinskii zhurnal* [Russian medical journal], 2010, vol. 18, no. 11, pp. 729–734 (in Russian).
3. Davydov S. O. *Comprehensive conservative treatment and total endoprosthetics in patients with deforming osteoarthritis of the hip joint in Transbaikalia*. Abstract of Ph. D. diss. St. Petersburg, 2003. 42 p. (in Russian).
4. Makolkin V. I., Pak Yu. V., Men'shikova I. V. Coxarthrosis – questions of etiology, epidemiology, clinical manifestations and new approaches to treatment. *Terapevticheskiy arkhiv* [Therapeutic archive], 2007, vol. 79, no. 1, pp. 81–85 (in Russian).
5. Beletsky A. V., Pashkevich L. A., Lomat L. N. Major achievements and prospects for further development of the orthopedic and traumatological service. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2011, no. 7, pp. 4–10 (in Russian).
6. Beletskii A. V., Mukhlya A. M., Lomat' L. N., Ral'ko E. A., Borisov A. V. Organizational aspects of endoprosthesis replacement of large joints. *Dostizheniya meditsinskoi nauki* [Advances in medical science], 2016, iss. 18, pp. 155–156 (in Russian).
7. Romanov G. N., Rudenko E. V. Modern problems of age-related diseases: osteoarthritis and osteoporosis. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2012, no. 8, pp. 26–29 (in Russian).
8. Mironov S. P., Omel'yanenko N. P., Orletskii A. K., Markov Yu. A., Karpov I. N. Osteoarthrosis: current state of the problem (analytical review). *Vestnik travmatologii i ortopedii imeni N. N. Priorova* [Vestnik of traumatology and orthopedics named after N. N. Priorov], 2001, no. 2, pp. 96–99 (in Russian).
9. Gerasimenko M. A., Beletskii A. V. *Osteoarthrosis*. Minsk, Publishing House of the Belarusian State Medical University, 2007. 48 p. (in Russian).
10. Qvistgaard E., Christensen R., Torp-Pedersen S., Bliddal H. Intra-articular treatment of osteoarthritis of the hip: a randomized study of hyaluronic acid, corticosteroid, and isotonic saline. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2006, vol. 14, no. 2, pp. 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.09.007>
11. Migliore A., Massafra U., Bizzi E., Lagana B., Germano V., Piscitelli P., Granata M., Tormenta S. Intra-articular injection of hyaluronic acid (MW 1500-2000 KDa; HyalOne®) in symptomatic osteoarthritis of the hip: a prospective cohort study. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 2011, vol. 131, no. 12, pp. 1677–1685. <https://doi.org/10.1007/s00402-011-1353-y>
12. Abate M., Pulcini D., Iorio A., Schiavone C. Viscosupplementation with intra-articular hyaluronic acid for treatment of osteoarthritis in the elderly. *Current Pharmaceutical Design*, 2010, vol. 16, no. 6, pp. 631–640. <https://doi.org/10.2174/138161210790883859>
13. Migliore A., Giovannangeli F., Granata M., Laganà B. Hylan G-F 20: review of its safety and efficacy in the management of joint pain in osteoarthritis. *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 2010, vol. 3, pp. 55–68. <https://doi.org/10.1177/117954411000300001>
14. Yusuf E. Metabolic factors in osteoarthritis: obese people do not walk on their hands. *Arthritis Research and Therapy*, 2012, vol. 14, no. 4, p. 123. <https://doi.org/10.1186/ar3894>
15. Kostina A. V., Ryzhkova V. A., Khasanov F. K., Muslov S. A., Lapshikhina E. A. Study of the body mass index of students of the Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A. I. Evdokimov. *Molodoi uchenyi* [Young scientist], 2018, no. 6, pp. 63–70 (in Russian).
16. World Health Organization (WHO). Global Database on Body Mass Index: BMI classification 2006. Available at: <http://www.assessmentpsychology.com/icbmi.htm> (accessed 24.06.2016).

### Информация об авторах

*Королько Андрей Степанович* – врач-травматолог. Многопрофильная медицинская компания «ЛОДЕ» (пр. Независимости, 58, 220005, г. Минск, Республика Беларусь).

*Сущевич Виктор Викторович* – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделом. Минская областная клиническая больница (223041, Минский р-н, аг. Лесной-1). E-mail: victor-vvs@mail.ru

*Евко Ярослав Иванович* – заведующий отделением. Минская областная клиническая больница (223041, Минский р-н, аг. Лесной-1).

*Кезля Олег Петрович* – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

### Information about the authors

*Andrei S. Korolko* – traumatologist. Multi-field medical company “LODE” (58, Nezavisimosti Ave., 220005, Minsk, Republic of Belarus).

*Victor V. Sushchevich* – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Head of the Department. Minsk Regional Clinical Hospital (223041, Minsk region, agro-town Lesnoi-1). E-mail: victor-vvs@mail.ru

*Yaroslav I. Yevko* – Head of the Department. Minsk Regional Clinical Hospital (223041, Minsk region, agro-town Lesnoi-1).

*Oleg P. Kezlya* – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

ISSN 1814-6023 (Print)  
ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 577.171.7+577.161.2+611.018  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-166-174>

Поступила в редакцию 12.09.2018  
Received 12.09.2018

**А. А. Астроўскі<sup>1</sup>, Ю. З. Максімчык<sup>1</sup>, В. А. Гурыновіч<sup>1</sup>,  
А. Б. Астроўская<sup>2</sup>, А. Г. Майсяёнак<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Інстытут біяхіміі біялагічна актыўных злучэнняў НАН Беларусі, Гродна, Рэспубліка Беларусь  
<sup>2</sup>Гродзенскі дзяржаўны медыцынскі ўніверсітэт, Гродна, Рэспубліка Беларусь*

## **ЗМЯНЕННЕ ГІСТАЛАГІчнай СТРУКТУРЫ СЕЛЯЗЁНкі ПАЦУКОЎ Пад уздзеяннем прэднізалона і яго камбінацыі з вітамінам D**

**Аннотация.** Изучена возможность использования витамина D для нормализации гистологической структуры селезенки лабораторных крыс, измененной под воздействием преднизолонa. Животным ежедневно внутривентриально на протяжении 3 недель вводили либо физиологический раствор, либо преднизолон в дозе 5 мг/кг массы, либо преднизолон в комбинации с витамином D (в дозе 800 МЕ/кг). Результаты проведенного морфометрического анализа показали, что введение преднизолонa ведет к значительному уменьшению размеров селезенки, объема белой пульпы и размеров герминативных центров лимфатических фолликулов в ее составе и к увеличению плотности размещения мегакариоцитов в красной пульпе органа. Указанные эффекты преднизолонa в различной степени нивелируются введением витамина D, в частности наблюдается тенденция к нормализации размеров герминативных центров селезенки. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения возможных механизмов коррекции витамином D иммунологической и гемопоэтической функций организма млекопитающих, измененных введением глюкокортикоидов.

**Ключевые слова:** селезенка крыс, преднизолон, витамин D, белая пульпа, герминативные центры, мегакариоциты, эозинофилы

**Для цитирования:** Змяненне гісталагічнай структуры селязёнкi пацукoў пад уздзеяннем прэднізалона і яго камбінацыі з вітамінам D / А. А. Астроўскі [і інш.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 166–174. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-1-166-174>

**A. A. Astrowski<sup>1</sup>, Yu. Z. Maksimchyk<sup>1</sup>, V. A. Gurinovich<sup>1</sup>, A. B. Astrowskaja<sup>2</sup>, A. G. Moiseenok<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Grodno, Republic of Belarus*

*<sup>2</sup>Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

## **HISTOLOGICAL CHANGES IN THE SPLEEN OF RATS UNDER THE INFLUENCE OF PREDNISOLONE AND ITS COMBINATION WITH VITAMIN D**

**Abstract.** The possibility of using vitamin D to normalize the histological structure of the spleen changed under the influence of prednisolone in rats was studied. The animals were subjected to the intragastric administration of saline and either prednisolone (5 mg/kg b. w.) or its combination with vitamin D (800 IU/kg) daily for 3 weeks. The results of morphometric analysis of spleen slices reveal that the administration of prednisolone leads to a significant decrease in spleen sizes, white pulp volume, and in sizes of germinal centers of lymphatic follicles within the white pulp, and to an increase in the number of megakaryocytes in the red pulp. Vitamin D alleviates histological changes due to the prednisolone treatment, in particular the substantial restoration in sizes of germinal centers in the spleen has been found. The data obtained suggest the benefits of further studies of possible mechanisms of vitamin D to normalize immunological and hematopoietic functions in subjects subjected to glucocorticoid treatment.

**Keywords:** rat spleen, prednisolone, Vitamin D, white pulp, germinal centers, megakaryocytes, eosinophils

**For citation:** Astrowski A. A., Maksimchyk Yu. Z., Gurinovich V. A., Astrowskaja A. B., Moiseenok A. G. Histological changes in the spleen of rats under the influence of prednisolone and its combination with vitamin D. *Vesti Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 166–174 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-1-166-174>

**Уводзіны.** Адно з агульнавядомых наступстваў глюкакартыкоіднай тэрапіі – прыгнечанне функцыі імуннай сістэмы. За выключэннем выпадкаў, калі на такі вынік адбываецца адмысловае нацэльванне, адзначаны эфект належыць да непажаданых. У сувязі з гэтым з'яўляецца актуальным пошук рэчываў, якія маглі б, не зніжаючы пазітыўных вынікаў прымянення глюкакартыкоідаў, памяншаць іх прыгнечальны ўплыў на імунную сістэму.

Вітамін D у гарманальнай форме ў многім з'яўляецца антаганістам глюкокартыкоідаў, якія прынцыпова па-рознаму ўзаемадзейнічаюць з клеткавымі рэцэптарамі да вітаміна D [1]. Гэта абгрунтоўвае параўнальнае вывучэнне ўплыву глюкокартыкоідаў на ключавыя органы імуннай сістэмы з іх сумесным з вітамінам D уздзеяннем.

Вядома, што ген *VDR* мае некалькі чуллівых да глюкокартыкоідаў элементаў (*glucocorticoid response elements*) [2], а рэцэптар *VDR* выяўляе кааператыўны эфект з *C/EBP*-рэцэптарам глюкокартыкоідаў у транскрыпцыі  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -гідраксілазы пад уздзеяннем глюкокартыкоідаў [3]. З іншага боку, вітамін D мадулюе сігналінг праз глюкокартыкоідны рэцэптар, уздзейнічае на экспрэсію генаў, рэгулюемых глюкокартыкоідамі, змяняе чуллівасць розных клетак да гармона [4].

Селязёнка, хаця і належыць не да цэнтральных, а да перыферычных органаў імуннай сістэмы, – адзін з самых буйных лімфоідных органаў млекакормячых. У чалавека яна – галоўная крыніца ўтварэння цыркулюючых лімфацытаў і манацытаў, у ёй прадукуюцца антыцелы [5]. Гэты орган дэпануе эрытрацыты, трамбацыты і разбурае іх, калі яны састарэлі ці пашкодзіліся [5]. У селязёнцы плада чалавека ўтвараюцца таксама эрытрацыты і гранулацыты, але перад нараджэннем гэтая функцыя перадаецца чырвонаму касцявому мозгу [6]. Аднак у многіх млекакормячых, у адрозненне ад чалавека, селязёнка на працягу ўсяго жацця выконвае шэраг дадатковых функцый [7]. Так, у селязёнцы пацукоў знаходзяцца мегакарыяцыты [8, 9], якія, як вядома, прадукуюць трамбацыты [10], а таксама ўтвараюцца і даспяваюць эзінафілы [11–13]. Апошняе дадаткова робіць селязёнку пацука цікавым аб'ектам навуковых пошукаў у сферы вывучэння гемапаэзу.

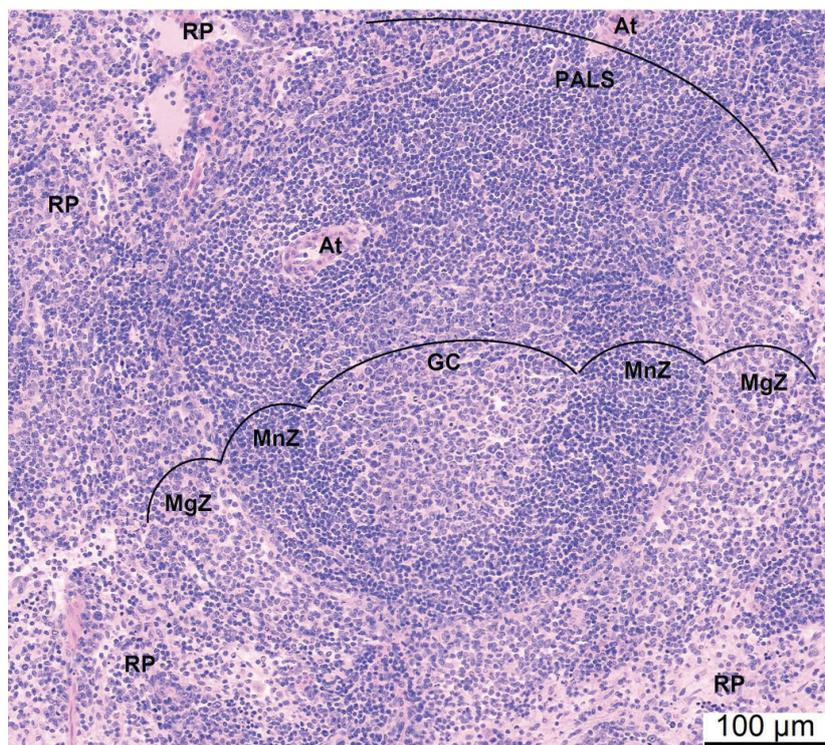
Мэта дадзенага даследавання – выяўленне ўплыву вітаміна D на некаторыя гісталагічныя параметры селязёнкі, якія характарызуюць імуналагічную і гемапаэтычную функцыі органа, змененыя ўвядзеннем прэднізалона.

**Матэрыялы і метады даследавання.** У даследаванні было выкарыстана 18 белых лабараторных пацукоў-самцоў сярэдняй масай 250 г. Жывёл выпадковым чынам падзялілі на тры групы па 6 штук у кожнай і размясцілі ў асобных клетках. Пацукам на працягу 21 сут унутрыстраўнікава ўводзілі альбо фізіялагічны раствор хларыда натрыя (жывёлы першай кантрольнай групы), альбо прэднізалон, распушчаны ў фізрастворы, у разліку 5 мг/кг масы (другая група, «прэднізалонавая»), альбо прэднізалон у адзначанай дазіроўцы разам з вітамінам D у дозе 800 МА/кг масы (трэцяя група, «прэднізалонава-вітамінавая»).

Праз суткі пасля апошняга ўвядзення названых рэчываў пацукоў забівалі шляхам хуткай дэкапітацыі, ускрывалі брушную поласць, забіралі і ўзважвалі селязёнку. Затым з органа выразалі папярочны ўчастак шырынёй каля 5–6 мм (апошні бралі з сярэдняй часткі пярэдняй паловы органа). Яго фіксавалі на працягу 4 гадзін у сумесі 40 %-нага фармаліна, 96-градуснага этылавага спірту, канцэнтраванай воцатнай кіслаты (суадносіны вадкасцяў 9:3:1 адпаведна) і пасля прамыўкі праточнай вадой залівалі ў парафін. Рабілі папярочныя зрэзы органа таўшчынёй 4 мкм, з якіх рыхтавалі гісталагічныя прэпараты, афарбаваныя гематаксілінам і эзінам.

Са зробленых прэпаратаў селязёнкі выбіралі найбольш якасныя зрэзы (бралі па адным ад кожнага органа), якія фатаграфавалі з дапамогай камеры *Panasonic Color CCTV (WV-CP410/G)*, выкарыстоўваючы 4-кратнае павелічэнне. Прычым рабілі гэта так, каб кожнае чарговае поле зроку па прынцыпе чарапіцы перакрывала папярэдняе. З атрыманых фота з дапамогай кампутарнай праграмы *Paint* складалі поўнае электроннае фота кожнага абранага зрэза. На ім з дапамогай кампутарнай праграмы *Image-Pro Plus* у ручным рэжыме вымяралі: агульную плошчу папярочнага зрэза органа, абсалютную плошчу чырвонай і белай пульпы ў ім (у склад белай пульпы ўключалі лімфатычныя фалікулы, складзеныя ў сваю чаргу з гермінатыўнай, мантыйнай ды маргінальнай зон, і лімфоідныя муфты селязёначных артэрыёл (мал. 1)). З атрыманых даных дадаткова вылічвалі адносную долю белай пульпы на зрэзах селязёнкі.

Выкарыстоўваючы 20-кратнае павелічэнне, на плошчы чырвонай пульпы знаходзілі і падлічвалі ўсе мегакарыяцыты (улічвалі толькі тыя з іх, якія мелі не менш двух ядраў у цытаплазме), ацэньвалі колькасць эзінафілаў рознай ступені спеласці. Дадаткова на гэтых жа зрэзах фатаграфавалі ( $\times 40$ ) па 20 выпадкова-паслядоўна знойдзеных зрэзаў мегакарыяцытаў з ядрамі і з дапамогай праграмы *Image-Pro Plus* вымяралі плошчы адзначаных клетак на зрэзах.



Мал. 1. Лімфатычны фалікул, лімфоідная муфта і чырвоная пульпа селязёнки пацука кантрольнай групы (складзена з асобных фота,  $\times 20$ ). GC – гермінатыўны цэнтр лімфатычнага фалікула; PALS – лімфоідная муфта; MnZ – манціяная зона лімфатычнага фалікула; MgZ – маргінальная зона; RP – чырвоная пульпа; At – фалікулярная артэрыя

Fig. 1. Lymphoid follicle, periarteriolar lymphoid sheath and red pulp of the rat spleen in the control group (composed of separate images,  $\times 20$ ). Abbreviations: GC – germinal center of a lymphatic follicle; PALS – periarteriolar lymphoid sheath; MnZ – mantle zone of a lymphatic follicle; MgZ – marginal zone; RP – red pulp; At – artery

Асобна фатаграфавалі ( $\times 10$ ) усе гермінатыўныя зоны лімфатычных фалікулаў, вылічвалі абсалютную і адносную плошчы гермінатыўных зон.

Усе атрыманыя колькасныя даныя апрацоўвалі з дапамогай статыстычных праграм *Prism5* і *STATISTICA 10*. Вынікі падавалі як сярэдняе арыфметычнае  $\pm$  памылка сярэдняй ( $M \pm m$ ). Для ацэнкі даставернасці адрозненняў паміж сярэднімі выкарыстоўвалі няпарны *t*-тэст, а таксама тэст Мана–Уітні. Даставернымі лічылі адрозненні пры  $p < 0,05$ .

**Вынікі і іх абмеркаванне.** Маса селязёнки была найбольшай у жывёл кантрольнай групы. У пацукоў «прэднізалонава-вітамінавай» групы яна аказалася ў 1,5 разы меншай, а ў жывёл чыста «прэднізалонавай» – у 2,2 разы меншай за кантрольную (гл. табл. 1).

Табліца 1. Змена масы селязёнки пацукоў пад уздзеяннем прэднізалона і прэднізалона ў камбінацыі з вітамінам D

Table 1. Changes of the spleen weight at the administration of prednisolone and prednisolone in combination with vitamin D

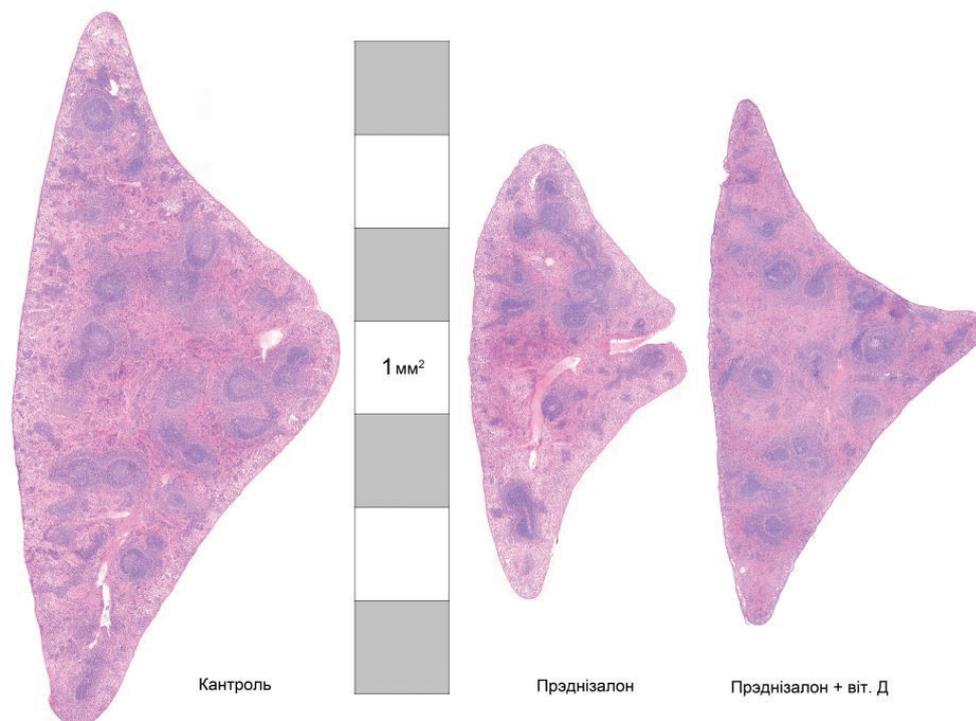
Група жывёл	Маса селязёнки, мг
1. Кантроль ( $n = 6$ )	$598 \pm 31,2$
2. Прэднізалон ( $n = 5$ )	$266 \pm 20,2^{**}$
3. Прэднізалон + вітамін D ( $n = 6$ )	$400 \pm 22,4^{**}$

З а ў в а г а. Тут і далей  $^{**} - p < 0,05$  у параўнанні з кантрольнай групай адпаведна як па няпарным *t*-тэсце, так і па тэсце Мана–Уітні.

Як вядома, селязёнка млекакормячых можа істотна змяняць сваю масу і будову ў залежнасці ад стану арганізма (напрыклад, пры інфекцыі, фізічнай нагрузцы [14]). Рэакцыі селязёнки ў адказ на ўвядзенне аднаго і таго ж прэпарата ў розных індывідаў істотна адрозніваюцца. Аднак

у большасці млекакормячых і чалавека прызначэнне прэднізалона вядзе да памяншэння памераў селязёнку, тармозіць працэс праліферацыі лімфацытаў у ёй [15, 16], што і назіралася ў большасці жывёл ў нашым даследаванні.

Форма і памеры атрыманых папярочных зрэзаў селязёнку (мал. 2, табл. 2) добра ўзгадняюцца з масай органа, вымеранай непасрэдна пасля забой жывёл. Так, плошча папярочнага сячэння селязёнку была найбольшай у кантрольных жывёл, найменшай – у пацукоў «прэднізалонавай» групы (58 % ад кантроля), і мела прамежкавае значэнне ў «прэднізалонава-вітамінавай» групе.



Мал. 2. Тыповыя адрозненні паміж папярочнымі зрэзамі, узятымі ад селязёнак пацукоў кантрольнай, «прэднізалонавай» і «прэднізалонава-вітамінавай» груп

Fig. 2. Typical cross-sectional view of the rat spleen in the control, prednisolone and prednisolone plus vitamin D treated groups

У прэпаратах селязёнку, узятай ад жывёл усіх трох груп, мяжа паміж белай і чырвонай пульпай была дастаткова добра бачная, што дазволіла зрабіць адпаведныя вымярэнні. Высветлілася, што ў селязёнках жывёл «прэднізалонавай» групы некалькі памяншаўся абсалютны аб'ём як чырвонай, так і белай пульпы, пры гэтым адносна доля белай пульпы таксама некалькі памяншалася (але недаставерна (табл. 2)). Тут у якасці заўвагі варта адзначыць, што самы распаўсюджаны на сённяшні дзень метада марфаметрыі, заснаваны на вымярэнні адноснай плошчы, якую займае белая пульпа ў асобных палях зроку мікраскопа (гл., напрыклад, [17, 18]), не дазваляе выявіць некаторыя з адрозненняў.

На адзначаныя эфекты прэднізалона мала паўплывала дадатковае ўвядзенне вітаміна D – зрухі ў кірунку нормы мелі месца, але не былі даставернымі (табл. 2).

Табліца 2. Прынцыповыя змены структуры селязёнку пацукоў пад уздзеяннем вялікіх доз прэднізалона і вітаміна D

Table 2. Main changes in the rat spleen structure at the administration of a high dose of prednisolone and vitamin D

Група жывёл	Агульная плошча папярочнага зрэза органа, мм <sup>2</sup>	Плошча чырвонай пульпы на зрэзе, мм <sup>2</sup>	Плошча белай пульпы на зрэзе, мм <sup>2</sup>	Адносная доля белай пульпы на зрэзе, %
1. Кантроль (n = 6)	13,2 ± 0,91	9,0 ± 0,45	4,2 ± 0,57	31,1 ± 2,32
2. Прэднізолон (n = 5)	7,7 ± 0,7**	5,6 ± 0,42**	2,1 ± 0,44**	26,4 ± 4,56
3. Прэднізолон + вітамін D (n = 6)	8,8 ± 0,42**	6,4 ± 0,36**	2,4 ± 0,27**	27,7 ± 2,3

Ва ўсіх жывёл кантрольнай групы ў складзе белай пульпы селязёнкі прысутнічаюць развітыя лімфатычныя фалікулы, створаныя ў асноўным сукупнасцю лімфацытаў ды макрафагаў, лакалізаваных вакол дробных артэрыяў. Ва ўсіх фалікулах ёсць добра развітая мантыйная (з найбольшай шчыльнасцю размяшчэння клетак) і маргінальная зоны. У фалікулах вялікага памеру цэнтральнае месца часта займае дастаткова вялікая гермінатыўная зона (гермінатыўны цэнтр), як правіла, авальнай формы, дыяметрам да 250 мкм і больш. Тут знаходзяцца многія лімфацыты у стане мітатычнага дзялення і, як правіла, у яшчэ большай колькасці групы апаптатычных цельцаў (апошнія лёгка выяўляюцца па фрагментах ядзернага матэрыялу). Мітозы і апаптатычныя цельцы сустракаюцца таксама і ў мантыйнай ды маргінальнай зонах фалікулаў, але ў значна меншай колькасці. Гэта пацвярджае, што ў селязёнцы асноўным месцам праліферацыі лімфацытаў (у асноўным В-лімфацытаў [7]) і іх адбору з'яўляюцца гермінатыўныя цэнтры лімфатычных фалікулаў. Уражвае, што колькасць груп апаптатычных цельцаў тут пераважае над колькасцю фігур мітоза. Назіраемую з'яву масавага апаптозу лімфацытаў у гермінатыўных цэнтрах лімфатычных фалікулаў селязёнкі, прынамсі часткова, варта лічыць праявай механізму фарміравання імуналагічнай талерантнасці да аўтаантыгенаў [19].

У жывёл «прэднізалонавай» групы лімфатычныя фалікулы выглядалі менш развітымі, а гермінатыўныя цэнтры, калі іх атрымлівалася аб'ектыўна выявіць, мелі мінімальныя памеры (табл. 3). У жывёл «прэднізалонава-вітамінавай» групы названыя адзнакі мелі прамежавую ступень выразнасці, прычым былі настолькі набліжанымі да кантрольных значэнняў, што ад іх даставерна не адрозніваліся. Такім чынам, дадатковае ўвядзенне вітаміна D прывяло да істотнага зруху у бок нармальнага стану памераў гермінатыўных цэнтраў, даставерна паменшаных пад уплывам прэднізалона.

Т а б л і ц а 3. Памер гермінатыўнай зоны (ГЗ) лімфатычных фалікулаў селязёнкі пацукоў

Table 3. Sizes of the germinal centers in lymphatic follicles of rat's spleen

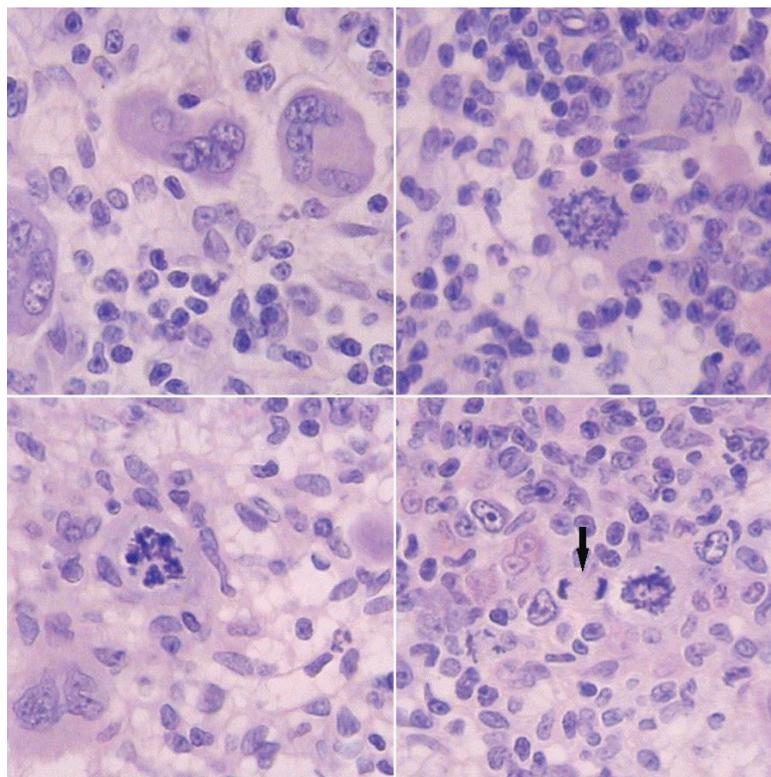
Група жывёл	Абсалютная плошча ГЗ на 1 зрэзе, мм <sup>2</sup>	Плошча ГЗ адносна плошчы зрэза, %	Плошча ГЗ адносна плошчы белай пульпы
1. Кантроль ( $n = 6$ )	0,075 ± 0,028	0,53 ± 0,18	1,71 ± 0,55
2. Прэднізалон ( $n = 5$ )	0,005 ± 0,003*	0,065 ± 0,04*	0,21 ± 0,13**
3. Прэднізалон + вітамін D ( $n = 6$ )	0,018 ± 0,01	0,226 ± 0,09	0,86 ± 0,32

З а ў в а г а. \* –  $p < 0,05$  у параўнанні з кантрольнай групай па няпарным  $t$ -тэсце.

З атрыманых намі даных вынікае, што такія колькасныя паказчыкі, як плошча папярочнага зрэза селязёнкі, плошча белай пульпы на ім, памер гермінатыўных цэнтраў лімфатычных фалікулаў, а таксама праліферацыя ды апаптоз лімфацытаў у складзе апошніх безумоўна могуць служыць індыкатарамі выніковасці ўздзеяння тых ці іншых рэчываў на імунную функцыю арганізма млекакормячых.

Чырвоная пульпа селязёнкі насычана эрытрацытамі, якія, як правіла, знаходзяцца ў прасвеце вянозных сінусаў. Тут жа, а яшчэ больш паміж сінусамі, у складзе так званых селязёнкавых (пульпарных) цяжоў Більротэ, прысутнічаюць лімфацыты, манацыты-макрафагі, нейтрафільныя ды эзінафільныя лейкацыты. У складзе злучальна-тканкавых трабекул селязёнкі бачны фібрабласты. У чырвонай пульпе таксама сустракаюцца мегакарыяцыты з гіганцкай па аб'ёме цытаплазмай і некалькімі ядрамі, якія размяшчаюцца альбо разам шчыльнай групай, альбо паўмесяцам, колам, васьмёркай (мал. 3). У складзе чырвонай пульпы дастаткова часта сустракаюцца клеткі ў стане мітатычнага дзялення, у тым ліку фігуры мітатычнага дзялення ядраў мегакарыяцытаў, якое адбываецца сінхронна (мал. 3).

У жывёл «прэднізалонавай» групы чырвоная пульпа ў цэлым выглядала менш насычанай клеткавымі элементамі ў параўнанні з кантролем, але ў ёй па-ранейшаму прысутнічала ўся іх разнастайнасць, характэрная для звычайнага стану селязёнкі. Што да мегакарыяцытаў, дык іх колькасць на адзінцы плошчы зрэза нават павялічылася (табл. 4).



Мал. 3. Мегакарыяцыты (на верхнім фота злева) і розныя фазы мітозу іх ядраў (на іншых фота) у селязёнцы пацука. На ніжнім фота справа стрэлкай паказана позняя анафаза мітозу звычайнай аднаядзернай клеткі.  $\times 40$

Fig. 3. Megakaryocytes (top, on the left) and different mitosis stages (other pictures) in the rat spleen. The arrow (bottom, on the right) indicates the late anaphase of mitosis in the regular mononuclear cell.  $\times 40$

Дадатковае ўвядзенне вітаміна D зрушвала асноўныя паказчыкі колькасці мегакарыяцытаў і мітозу іх ядраў у кірунку нормы, але ключавы з іх – шчыльнасць размяшчэння мегакарыяцытаў у чырвонай пульпе – не цалкам вяртала да кантрольных значэнняў (табл. 4).

Табліца 4. Шчыльнасць размяшчэння, памеры і мітозы ядраў мегакарыяцытаў (МКЦ)

Table 4. Amounts and sizes of megakaryocytes and the nuclei mitoses in megakaryocytes

Група жывёл	Колькасць МКЦ на 1 зрэзе	Колькасць МКЦ на 1 мм <sup>2</sup> чырвонай пульпы	Сярэдняя плошча МКЦ на зрэзе, мкм <sup>2</sup>	Знойдзена мітозаў МКЦ на 1 зрэзе	Мітатычны індэкс МКЦ, %
1. Кантроль ( $n = 6$ )	$93,7 \pm 14,2$	$10,4 \pm 1,42$	$341 \pm 8,1$	$0,67 \pm 0,49$	$7,32 \pm 5,8$
2. Прэднізалон ( $n = 5$ )	$154 \pm 34,6$	$26,9 \pm 4,9^{**}$	$335 \pm 9,0$	$1,8 \pm 0,7$	$13,4 \pm 4,0$
3. Прэднізалон + вітамін D ( $n = 6$ )	$122 \pm 19,4$	$19,0 \pm 2,9^{**}$	$371 \pm 10,3^*$	$0,50 \pm 0,2$	$5,86 \pm 3,2$

З а ў в а г а. \* –  $p < 0,05$  у параўнанні з кантрольнай групай па няпарным  $t$ -тэсце.

Як вядома, мегакарыяцыты развіваюцца з плюрыпатэнтнай гемапаэтычнай камлёвай клеткі, праходзячы адпаведныя этапы клеткавай камітацыі [20]. Адносна спелы мегакарыяцыт губляе здольнасць да дзялення, але здольны да рэплікацыі ДНК. Гэты працэс завяршаецца сінхронным мітатычным дзяленнем усіх ядраў мегакарыяцыта, але без наступнага цытакінэзу [21, 22]. У выніку мегакарыяцыт набывае канчатковую поліплоідную форму. Заўважана, што формула спадчыннага матэрыяла ў мегакарыяцытах чалавека можа павялічыцца да  $64n$ , у мышэй – да  $256n$  [20].

Атрымліваецца, што павелічэнне шчыльнасці размяшчэння мегакарыяцытаў у чырвонай пульпе селязёнкі, асабліва выразнае ў жывёл «прэднізалонавай» групы, нельга тлумачыць уласнай праліферацыяй мегакарыяцытаў. Гэта можа быць абумоўлена альбо больш хуткім

утварэннем дадзеных клетак з адпаведных папярэдніц (пра што сведчыць тэндэнцыя да павышэння мітатычнага індэкса мегакарыяцытаў), альбо іх «канцэнтраваннем» у селязёнцы, якая стала меншай па аб'ёму (гл. табл. 1, 2), альбо першым і другім адначасова.

У чырвонай пульпе селязёнкі пацукоў адбываюцца праліферацыя і даспяванне эзінафілаў. Пра апошнія сведчаць як групавое знаходжанне эзінафілаў у чырвонай пульпе (групамі ад 2–3 штук да 2–3 і больш дзясяткаў), так і карціны мітатычнага дзялення іх няспелых форм. Колькасць эзінафілаў у чырвонай пульпе селязёнкі асабліва моцна вагалася ў жывёл «прэднізалонава-вітамінавай групы», але ў сярэднім у пацукоў усіх трох груп была блізкай.

Нарэшце, апошні заўважаны намі феномен, які варта ўзгадаць, гэта большае кровапаўненне чырвонай пульпы селязёнкі ў жывёл «прэднізалонава-вітамінавай» групы, чым у жывёл першых дзвюх груп.

У цэлым, праведзенае даследаванне сведчыць аб перспектыўнасці далейшага вывучэння магчымасці карэкцыі вітамінам D імуналагічнай ды гемапаэтычнай функцыі арганізма млекакормячых, змененых уздзеяннем глюкокартыкоідаў. У перспектыўных даследаваннях павінен быць выкарыстаны большы дыяпазон доз вітаміна D, а ключавыя працэсы прасочаны ў дынаміцы.

Такім чынам, палімарфізм у механізмах актыўнасці вітаіна D набывае новыя рысы і можа быць пашыраны не толькі на імунамадулюючыя, але і на гемапаэтычныя функцыі. Магчыма, гэта звязана з рэгулюючымі ўласцівасцямі гарманальнай формы вітаміна на сігнальны каскад PI3K/AKT/mTOR [23] ці адлюстроўвае агульныя эфекты кальцыферолаў на працэсы праліферацыі.

**Заклучэнне.** З пункту гледжання клеткава-біялагічных доследаў, селязёнка пацука з'яўляецца важным дадатковым органам імунагенэзу і гемапаэзу. Пад уздзеяннем прэднізалона ў абраным варыянце яго выкарыстання назіраецца скарачэнне агульных памераў селязёнкі, аб'ёмаў яе чырвонай і белай пульпы, памераў гермінатыўных цэнтраў лімфатычных фалікулаў органа. Аднак у чырвонай пульпе павялічваецца шчыльнасць размяшчэння мегакарыяцытаў. Вітамін D у выкарыстанай дозе зрушвае некаторыя з паказчыкаў морфафункцыянальнага стану селязёнкі ў бок нармалізацыі. Асабліва значна набліжаюцца да нормы памеры гермінатыўных цэнтраў лімфатычных фалікулаў органа, што сведчыць аб імунатропнасці гарманальнай формы кальцыферолаў.

**Канфлікт інтарэсаў.** Аўтары заяўляюць аб адсутнасці канфлікту інтарэсаў.

**Падзякі.** Праца выканана ў межах праекта 5.11 «Аптымізацыя біядаступнасці вітаміна D пры недастатковасці вітаміна і выкарыстанні розных кальцый-утрымліваючых субстанцый» Дзяржаўнай праграмы навуковых даследаванняў «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 State Scientific Research Program “Chemical technologies and materials”.

### Спіс выкарыстаных крыніц

1. Godschalk, M. Glucocorticoids decrease vitamin D receptor number and gene expression in human osteosarcoma cells / M. Godschalk, J. R. Levy, R. W. Downs // *J. Bone Miner. Res.* – 1992. – Vol. 7, N 1. – P. 21–27. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070105>
2. Hidalgo, A. A. Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor / A. A. Hidalgo, D. L. Trump, C. S. Johnson // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 121, N 1–2. – P. 372–375. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.081>
3. Dhawan, P. Novel regulation of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase (24(OH)ase) transcription by glucocorticoids: cooperative effects of the glucocorticoid receptor, C/EBP beta, and the Vitamin D receptor in 24(OH)ase transcription / P. Dhawan, S. Christakos // *J. Cell Biochem.* – 2010. – Vol. 110, N 6. – P. 1314–1323. <https://doi.org/10.1002/jcb.22645>
4. Kassi, E. Vitamin D affects glucocorticoid action in target cells / E. Kassi, N. Nasiri-Ansari, A. G. Papavassiliou // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 5. – P. 7220–7221. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13997>
5. Moore, K. L. *Clinically Oriented Anatomy* / K. L. Moore, A. F. Dalley. – 5th ed. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2005. – 1029 p.
6. Cumano, A. Ontogeny of the hematopoietic system / A. Cumano, I. Godin // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 25, N 1. – P. 745–785. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141538>
7. Steiniger, B. S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice / B. S. Steiniger // *Immunology.* – 2015. – Vol. 145, N 3. – P. 334–346. <https://doi.org/10.1111/imm.12469>

8. Effects of betel nut on cardiovascular risk factors in a rat model / M. P. Iqbal [et al.] // *BMC Cardiovasc. Disord.* – 2012. – Vol. 12. – Art. 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-12-94>
9. Marien, G. J. Splenic megakaryocytes and circulating platelets in pregnant rats / G. J. Marien, K. D. McFadden // *Am. J. Anat.* – 1970. – Vol. 128, N 2. – P. 225–233. <https://doi.org/10.1002/aja.1001280207>
10. Megakaryocyte function and dysfunction / A. Eldor [et al.]. // *Baillieres Clin. Haematol.* – 1989 – Vol. 2, N 3. – P. 543–568. [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(89\)80033-2](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(89)80033-2)
11. Davoine, F. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity / F. Davoine, P. Lacy // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – Art. 570. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00570>
12. Thermal injury increases the number of eosinophil progenitors in rat spleen and bone marrow / J. G. Noel [et al.] // *Inflammation.* – 2001. – Vol. 25, N 5. – P. 339–349.
13. Bro-Rasmussen, F. Effect of Cortisol on the Eosinophils in the Rat Spleen. Autoradiographic Studies / F. Bro-Rasmussen // *Scan. J. Haematol.* – 1973. – Vol. 11, N 1. – P. 59–70. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1973.tb00096.x>
14. Shephard, R. J. Responses of the human spleen to exercise / R. J. Shephard // *J. Sports Sci.* – 2016. – Vol. 34, N 10. – P. 929–936. <https://doi.org/10.1080/02640414.2015.1078488>
15. The hematopoietic effects of prednisone therapy in four infants with osteopetrosis / J. D. Reeves [et al.] // *J. Pediatr.* – 1979. – Vol. 94, N 2. – P. 210–214. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(79\)80825-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(79)80825-2)
16. Prednisone treatment inhibits the differentiation of B lymphocytes into plasma cells in MRL/MpSlac-lpr mice / S.-X. Yan [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2015. – Vol. 36, N 11. – P. 1367–1376. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.76>
17. Бобрышева, И. В. Морфологическая реактивность селезенки крыс различных возрастных периодов при иммуностимуляции / И. В. Бобрышева // *Журн. клін. та експерим. мед. досліджень.* – 2013. – Т. 1, № 3. – С. 315–321.
18. Кащенко, С. А. Особенности гистологического строения белой пульпы селезенки крыс в разные периоды постнатального онтогенеза в условиях экспериментальной иммуносупрессии / С. А. Кащенко, И. В. Бобрышева // *Журн. Гродн. гос. мед. ун-та.* – 2014. – № 1. С. 51–54.
19. Hogquist, K. A. Central tolerance: learning self-control in the thymus / K. A. Hogquist, T. A. Baldwin, S. C. Jameson // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5, N 10. – P. 772–782. <https://doi.org/10.1038/nri1707>
20. Gordon, M. S. Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia / M. S. Gordon, R. Hoffman // *Blood.* – 1992. – Vol. 80, N 2. – P. 302–307.
21. Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte endomitosis / L. Lordier [et al.] // *Cell Cycle.* – 2012. – Vol. 11, N 23. – P. 4385–4389. <https://doi.org/10.4161/cc.22712>
22. Anastasi, J. Some observations on the geometry of megakaryocyte mitotic figures: Buckyballs in the bone marrow / J. Anastasi // *Blood.* – 2011. – Vol. 118, N 24. – P. 6473–6474. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374074>
23. Lisse, T. S. Vitamin D. A new player in the world of mTOR signaling / T. S. Lisse, M. Hewison // *Cell Cycle.* – 2011. – Vol. 10, N 12. – P. 1888–1889. <https://doi.org/10.4161/cc.10.12.15620>

## References

1. 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. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070105>
2. Hidalgo A. A., Trump D. L., Johnson C. S. Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, vol. 121, no. 1–2, pp. 372–375. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.081>
3. Dhawan P., Christakos S. Novel regulation of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase (24(OH)ase) transcription by glucocorticoids: cooperative effects of the glucocorticoid receptor, C/EBP beta, and the Vitamin D receptor in 24(OH)ase transcription. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, vol. 110, no. 6, pp. 1314–1323. <https://doi.org/10.1002/jcb.22645>
4. Kassi E., Nasiri-Ansari N., Papavassiliou A. G. Vitamin D affects glucocorticoid action in target cells. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 5, pp. 7220–7221. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13997>
5. Moore K. L., Dalle A. F. *Clinically Oriented Anatomy. 5th ed.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 1029 p.
6. Cumano A., Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual Review of Immunology*, 2007, vol. 25, no. 1, pp. 745–785. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141538>
7. Steiniger B. S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology*, 2015, vol. 145, no. 3, pp. 334–346. <https://doi.org/10.1111/imm.12469>
8. Iqbal M. P., Mehboobali N., Haider G., Pervez S., Azam I. Effects of betel nut on cardiovascular risk factors in a rat model. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2012, vol. 12, art. 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-12-94>
9. Marien G. J., McFadden K. D. Splenic megakaryocytes and circulating platelets in pregnant rats. *American Journal of Anatomy*, 1970, vol. 128, no. 2, pp. 225–233. <https://doi.org/10.1002/aja.1001280207>
10. Eldor A., Vlodavsky I., Deutsch V., Levine R. F. Megakaryocyte function and dysfunction. *Baillière's Clinical Haematology*, 1989, vol. 2, no. 3, pp. 543–568. [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(89\)80033-2](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(89)80033-2)
11. Davoine F., Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology*, 2014, vol. 5, art. 570. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00570>
12. Noel J. G., Wells D. A., Guo X., Kong F., Lovell G. J., Ogle C. K. Thermal injury increases the number of eosinophil progenitors in rat spleen and bone marrow. *Inflammation*, 2001, vol. 25, no. 5, pp. 339–349.

13. Bro-Rasmussen F. Effect of cortisol on the eosinophils in the rat spleen. Autoradiographic studies. *Scandinavian Journal of Haematology*, 1973, vol. 11, no. 1, pp. 59–70. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1973.tb00096.x>
14. Shephard R. J. Responses of the human spleen to exercise. *Journal of Sports Sciences*, 2016, vol. 34, no. 10, pp. 929–936. <https://doi.org/10.1080/02640414.2015.1078488>
15. Reeves J. D., Huffer W. E., August C. S., Hathaway W. E., Koerper M., Walters C. E. The hematopoietic effects of prednisone therapy in four infants with osteopetrosis. *Journal of Pediatrics*, 1979, vol. 94, no. 2, pp. 210–214. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(79\)80825-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(79)80825-2)
16. Yan S.-X., Deng X.-M., Wang Q.-T., Sun X.-J., Wei W. Prednisone treatment inhibits the differentiation of B lymphocytes into plasma cells in MRL/MpSlac-lpr mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2015, vol. 36, no. 11, pp. 1367–1376. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.76>
17. Bobrysheva I. V. Morphological reactivity of rat spleen during different ages at immunostimulation. *Zhurnal klinichnikh ta eksperimental'nikh medichnikh doslidzhen' = Journal of Clinical and Experimental Medical Research*, 2013, vol. 1, no. 3, pp. 315–320 (in Russian).
18. Kashchenko S. A., Bobrysheva I. V. Features of histological structure in the white pulp of rat spleen during different periods of postnatal ontogenesis under experimental immunosuppression. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of Grodno State Medical University*, 2014, no. 1, pp. 51–54 (in Russian).
19. Hogquist K. A., Baldwin T. A., Jameson S. C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology*, 2005, vol. 5, no. 10, pp. 772–782. <https://doi.org/10.1038/nri1707>
20. Gordon M. S., Hoffman R. Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood*, 1992, vol. 80, no. 2, pp. 302–307.
21. Lordier L., Pan J., Naim V., Jalil A., Badirou I., Rameau P., Larghero J., Debili N., Rosselli F., Vainchenker W., Chang Y. Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte endomitosis. *Cell Cycle*, 2012, vol. 11, no. 23, pp. 4385–4389. <https://doi.org/10.4161/cc.22712>
22. Anastasi J. Some observations on the geometry of megakaryocyte mitotic figures: Buckyballs in the bone marrow. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 24, pp. 6473–6474. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374074>
23. Lisse T. S., Hewison M. Vitamin D. A new player in the world of mTOR signaling. *Cell Cycle*, 2011, vol. 10, no. 12, pp. 1888–1889. <https://doi.org/10.4161/cc.10.12.15620>

### 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](mailto:astrowski@gmail.com)

*Максимчик Юрий Зигмундович* – науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [y.maksimchyk@ibiochemistry.by](mailto:y.maksimchyk@ibiochemistry.by)

*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](mailto:val@bioch.basnet.by)

*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](mailto:astrowskaja@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](mailto: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](mailto:astrowski@gmail.com)

*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: [y.maksimchyk@ibiochemistry.by](mailto:y.maksimchyk@ibiochemistry.by)

*Valery A. Gurynovich* – Ph. D. (Biol.), 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: [val@bioch.basnet.by](mailto:val@bioch.basnet.by)

*Aksana B. Astrowskaja* – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [astrowskaja@gmail.com](mailto:astrowskaja@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](mailto:andrey.moiseenok@tut.by)

**А. В. Пырочкин<sup>1</sup>, А. М. Пристром<sup>1</sup>, В. С. Пилогович<sup>1</sup>, Д. Н. Горецкая<sup>1</sup>, Т. М. Юрага<sup>1</sup>,  
Т. Д. Борисенко<sup>2</sup>, Е. А. Воробьева<sup>1</sup>, О. М. Соловей<sup>1</sup>, П. Ф. Черноглаз<sup>1</sup>, В. В. Веселов<sup>2</sup>,  
И. Е. Лушникова<sup>2</sup>, С. Е. Пискунов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>1-я городская клиническая больница, Минск, Республика Беларусь

## ДИАГНОСТИКА КОНТРАСТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕФРОПАТИИ ПОСЛЕ ЧРЕСКОЖНОГО КОРОНАРНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

**Аннотация.** Изучены возможности ранней диагностики развития контраст-индуцированной нефропатии при выполнении плановой коронарографии и чрескожного коронарного вмешательства у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца, а также предикативные способности современных биомаркеров в сравнении с креатинином сыворотки. Исходный уровень  $\beta$ 2-микроглобулина сыворотки  $>1,1$  мг/л свидетельствует о высоком риске развития осложнений. При повышении через 24 ч уровня цистатина С (на 25 % от исходного,  $>1,064$  мг/л) или  $\beta$ 2-микроглобулина ( $>1,42$  мг/л) в крови острое повреждение почек диагностируется раньше, чем по динамике креатинина, что может быть использовано в рутинной клинической практике. Определение уровня липокалина нейтрофилов в моче повышает точность диагностики, но затруднительно в рутинной практике.

**Ключевые слова:** контрастиндуцированная нефропатия, ишемическая болезнь сердца, цистатин С,  $\beta$ 2-микроглобулин, липокалин нейтрофилов

**Для цитирования:** Диагностика контраст-индуцированной нефропатии после чрескожного коронарного вмешательства / А. В. Пырочкин [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 175–184. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-175-184>

**A. V. Pyrochkin<sup>1</sup>, A. M. Prystrom<sup>1</sup>, V. S. Pilotovich<sup>1</sup>, D. N. Horetskaya<sup>1</sup>, T. M. Yuraga<sup>1</sup>, T. D. Borisenko<sup>2</sup>,  
E. A. Varabyova<sup>1</sup>, O. M. Solovey<sup>1</sup>, P. F. Chernoglaz<sup>1</sup>, V. V. Veselov<sup>2</sup>, I. E. Lushnikova<sup>2</sup>, S. E. Piskunov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>1st Minsk City Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus

## DIAGNOSTICS OF CONTRASTINDUCATED NEPHROPATHY AFTER PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION

**Abstract.** The present study is devoted to search for the opportunities of early diagnosis of the development of contrast-induced nephropathy when performing coronary angiography and percutaneous coronary intervention in patients with a chronic ischemic heart disease. The predicative ability of modern biomarkers was studied in comparison with serum creatinine. Baseline serum  $\beta$ 2-microglobulin levels  $>1.1$  mg/l can be attributed to patients at a high risk of developing complications. Increasing the level of cystatin C in the blood by 25 % from baseline after 24 hours or  $>1.064$  mg/l, increasing the level of  $\beta$ 2-microglobulin in blood after 24 hours  $> 1.42$  mg/l allows you to diagnose acute kidney damage, before the creatinine dynamics and can be used in routine clinical practice. The determination of neutrophil lipocalin in the urine improves the accuracy of diagnosis, but is difficult in routine practice.

**Keywords:** contrast-induced nephropathy, coronary heart disease, cystatin C,  $\beta$ 2-microglobulin, neutrophil lipocalin

**For citation:** Pyrochkin A. V., Prystrom A. M., Pilotovich V. S., Horetskaya D. N., Yuraga T. M., Borisenko T. D., Varabyova E. A., Solovey O. M., Chernoglaz P. F., Veselov V. V., Lushnikova I. E., Piskunov S. E. Diagnostics of contrastinduced nephropathy after percutaneous coronary intervention. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 175–184 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-175-184>

**Введение.** Контраст-индуцированная нефропатия (КИН) – острое ятрогенное повреждение почек (ОПП), возникающее, при исключении других альтернативных причин, после внутрисосудистого введения йодсодержащего рентгеноконтрастного средства (РКС). Для диагностики КИН обычно используется международная классификации ОПП (KDIGO) (1С) с оценкой стадии тяжести. КИН диагностируется при наличии одного из критериев: повышение креатинина сыворотки

(sCr) на  $\geq 26,5$  мкмоль/л от исходного уровня в течение 48 ч или повышение sCr в 1,5 раза по сравнению с известным исходным уровнем в течение недели до исследования. Если значения sCr в течение недели до исследования не известны, то используется наименьшее за 3 мес. его значение [1].

Поскольку sCr является медленным индикатором при ОПП, в последнее время предложено несколько биомаркеров тубулярного повреждения (плазменный *n*-ацетил-бета-глюкозамин, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (sNGAL), плазменный цистатин С (sCysC), мочевого интерлейкин-18 (IL-18), мочевого белок, связывающий жирные кислоты (uL-FABP), мочевого-N-ацетил-бета-глюкозаминидаза (ubNAG)). Наибольшую доказательную базу дает применение  $\beta$ 2-микроглобулина ( $\beta$ 2-MG), цистатина С (CysC) и NGAL.

$\beta$ 2-MG – низкомолекулярный (11 800 дальтон) белок поверхностных антигенов клеточных ядер, который нековалентно связан с легкой цепью антигена главного комплекса гистосовместимости. У взрослых скорость продукции этого белка относительно постоянна. Присутствие его в сыворотке обусловлено процессами дегенерации и репарации отдельных элементов клеток. При повреждении клеток проксимальных канальцев вследствие заболевания почек, лекарственной интоксикации, токсического воздействия и т. д. экскреция  $\beta$ 2-MG с мочой возрастает. Поэтому определение  $\beta$ 2-MG мочи используют в качестве маркера поражения проксимальных канальцев почек.

В качестве гломерулярного тест-агента был предложен CysC – ингибитор цистеиновой протеиназы массой 13 кДа, который продуцируется всеми ядродержащими клетками с постоянной скоростью, свободно фильтруется через клубочковую мембрану, полностью метаболизируется в почках и не секретируется проксимальными почечными канальцами. Принято считать, что продукция CysC, в отличие от Cr, мало зависит от таких факторов, как возраст, пол, мышечная масса и уровень гидроволемии организма. Предполагается также, что элиминация CysC более чем на 99 % осуществляется почками путем гломерулярной фильтрации, а в интактном виде его молекула не подвергается канальцевой секреции и реабсорбции.

NGAL был обнаружен биологом L. Kjeldsen в 1993 г. Данный маркер имеет несколько названий: липокалин нейтрофилов, липокалин 2 и онкогенный белок 24p33. Он синтезируется в трубчатых эпителиальных клетках проксимального и дистального сегментов почки. У здорового человека NGAL в крови не определяется либо имеется в небольшой концентрации в различных тканях или органах с активированными эпителиальными клетками. В то же время концентрация NGAL как в моче, так и в плазме крови увеличивается пропорционально тяжести и длительности почечного повреждения. Маркер определяется как в сыворотке крови, так и в моче [2–4].

Цель исследования – поиск возможностей ранней диагностики развития контраст-индуцированной нефропатии при выполнении плановой коронарографии и чрескожного коронарного вмешательства у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца.

**Материалы и методы исследования.** Для оценки возможности ранней лабораторной диагностики КИН у кардиологических пациентов на базе УЗ «1-я ГКБ» г. Минска организовано проведение открытым методом одноцентрового, проспективного, контролируемого клинического исследования.

Перед проведением плановой коронарографии (КГР) и чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) кардиологическим пациентам производили забор крови из локтевой вены в состоянии покоя и положении сидя, не ранее чем через 12 ч после приема пищи. Выполняли лабораторные исследования: общий анализ мочи, биохимический анализ крови на калий (К), sCr, мочевины (Urea), исследование липидного состава плазмы крови. Дополнительно определяли концентрации  $\beta$ 2-MG, sCysC, sNGAL плазмы крови. Функциональное состояние почек включало оценку фильтрационной функции клубочка (отношение микроальбуминурии/протеинурии к экскреции Cr (ACR), расчет СКФ для Cr, CysC [5, 6]) и состояния тубулярного эпителия (суточный диурез, удельная плотность мочи, экскреция  $\beta$ 2-MG, uCysC, uNGAL, а также микроскопия осадка мочи) исходно, через 24 и 48 ч после оперативного вмешательства.

В соответствии с установленной в клинике практикой (плановое стентирование проводится в день госпитализации или на следующий день) пациенты получали внутривенную гидратацию

0,9 %-ным NaCl со скоростью 1 мл/кг/ч за 3 ч до, во время и в течение 4–12 ч после ЧКВ. При ЧКВ использовали неионные изоосмолярные РКС Iodixanol и Iohexol. Объем РКС > 140 мл определялся как «большой». КГР и ЧКВ выполняли опытные рентгеноэндоваскулярные хирурги в соответствии с международными рекомендациями по реваскуляризации миокарда [7].

Количественное определение CysC в плазме крови и моче осуществляли с помощью иммуно-турбодиметрического анализа с латексным усилением по калибровочной кривой с использованием реактивов и калибраторов DIALAB (Австрия), референсные значения для крови – 0,4–1,2 мг/л, для мочи – 0,52–1,4 мг/дл.

Уровень sNGAL определяли с помощью иммунотурбодиметрического анализа с латексным усилением по калибровочной кривой с использованием реактивов и калибраторов Audit Diagnostics (Ирландия), референсные значения для крови – 37–106 нг/мл.

Уровень uNGAL определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA), референсные значения – 0,9–9,0 нг/мл.

Для исследования  $\beta 2$  MG в плазме и моче использовали турбидиметрическое измерение. Помутнение биоматериала было обусловлено образованием нерастворимых иммунных комплексов антиген–антитело. Референсные значения для крови – 0,8–1,8 мг/л, для мочи – <5 мг/дл.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA 5.5, StatSoft Corp., США (лицензия № AXXR010A934027FA) для медико-биологических исследований. Значения изучаемых показателей представлены в виде среднего арифметического значения (M) и среднего квадратичного (стандартного) отклонения (SD), а особо асимметричные вариационные ряды – в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала [25-й; 75-й процентиль]. Поскольку практически все вариационные ряды не удовлетворяли критериям нормального распределения, использовали непараметрические методы статистики: при сравнении двух независимых групп – *U*-критерий Манна–Уитни, при сравнении двух зависимых групп – *T*-критерий Вилкоксона. Для сравнения групп по качественному признаку использовали  $\chi^2$ -критерий Пирсона, по бинарному признаку – точный критерий Фишера. Непараметрический корреляционный анализ осуществляли по Спирмену, ROC-анализ – путем построения кривых чувствительность–специфичность. Достоверность различий в группах была принята при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Базовые клинические характеристики пациентов, у которых после проведения плановой КГР и ЧКВ развилась КИН, и пациентов, не имеющих осложнений, представлены в таблице. КИН по sCr развилась у 37 (16,4 %) из 226 пациентов: в первые сутки после ЧКВ – у 19 (8,4 %), во вторые – у 18 (8,0 %). По критериям повышения sCysC [8] КИН развилась у 68 (30 %) пациентов.

Пациенты статистически значимо не отличались по возрасту, полу, индексу массы тела, наличию артериальной гипертензии ( $p > 0,05$ ), перенесенного ранее инфаркта миокарда ( $p > 0,05$ ), сосудистого поражения и по количеству имплантированных стентов ( $p > 0,05$ ), приему лекарственных препаратов ( $p > 0,05$ ), частоте использования «большого» объема РКС, распределению в группы риска по шкале Мехран [6].

В группе пациентов с КИН оказалось больше лиц, страдавших сахарным диабетом (37 и 22 % соответственно,  $p = 0,044$ , при этом корреляционная связь между этим параметром и развитием КИН оказалась слабой ( $r = 0,13$ ,  $p < 0,05$  для критерия Спирмена) и со сниженной до менее 50 % фракцией выброса левого желудочка (51 и 26 % соответственно,  $p = 0,002$ , однако при этом корреляционная связь между этим параметром и развитием КИН оказалась слабой ( $r = 0,20$ ,  $p < 0,05$  для критерия Спирмена).

Серийные изменения в изучаемых биомаркерах плазмы крови и мочи представлены в таблице. В группе с КИН базовые уровни Cr были ниже, чем в группе сравнения [101,5 (25,5) и 84,9 (20,6) мкмоль/л соответственно,  $p < 0,001$ ], которые, однако, значительно возросли через 24 и 48 ч. Это же касается расчетных показателей СКФ по формулам СКD-EPI для Cr и СКD-EPI для CysC. Исходные уровни sCysC статистически значимо не отличались в обеих группах, однако заметно выросли через 24 и 48 ч. Сравнивая темпы прироста sCr и sCysC, следует отметить, что пиковые значения sCr были выявлены через 48 ч, в то время как максимальный прирост sCysC

## Характеристика пациентов, перенесших КГР и ЧКВ

## Characteristics of patients undergoing coronary angiography and percutaneous coronary intervention

Показатель	Пациенты без КИН ( <i>n</i> = 189)	Пациенты с КИН ( <i>n</i> = 37)	<i>p</i>
Возраст, лет (%)	65 (9)	67 (7)	0,242
Возраст ≥70 лет, <i>n</i> (%)	67 (35)	14 (38)	0,781
Мужчины, <i>n</i> (%)	132 (70)	22 (59)	0,215
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup> (%)	29,7 (9,7)	28,6 (5,4)	0,488
<i>Клиническая характеристика</i>			
Сахарный диабет, <i>n</i> (%)	42 (22)	14 (37)	0,044*
ФВ ЛЖ, % (%)	53 (8)	50 (6)	0,007*
ФВ ЛЖ < 50 %, <i>n</i> (%)	50 (26)	19 (51)	0,002*
Объем РКС, мл (%)	255 (151)	283 (171)	0,348
Объем РКС >140 мл, <i>n</i> (%)	127 (67)	30 (81)	0,093
<i>Группы риска по Mehran, <i>n</i> (%)</i>			
1-я	102 (54)	16 (43)	0,478
2-я	73 (38)	18 (49)	
3-я	14 (8)	3 (8)	
<i>Лабораторные показатели, <i>n</i> (%)</i>			
Сг, мкмоль/л:			
исходно	101,5 (25,5)	84,9 (20,6)	<0,001*
через 24 ч	100,9 (28,5)	108,9 (29,3)	0,096
через 48 ч	102,7 (29)	119,2 (32,8)	0,001*
sCysC, мг/л:			
исходно,	0,98 (0,43)	0,96 (0,38)	0,584
через 24 ч	1,04 (0,54)	1,42 (0,51)	<0,001*
через 48 ч	1,05 (0,58)	1,39 (0,83)	<0,001*
СКД-ЕРІ, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup> :			
для Сг исходно	65 (917)	74 (19)	0,006*
для Сг через 24 ч	67 (22)	61 (22)	0,056
для Сг через 48 ч	66 (21)	63 (23)	0,024*
для Сг и CysC	78 (21)	84 (23)	0,081
для Сг и CysC через 24 ч	78 (24)	62 (20)	<0,001*
для Сг и CysC через 48 ч	78 (23)	63 (23)	<0,001*
sβ2-MG, мг/л:			
исходно	0,97 (0,25)	1,23 (0,42)	<0,001*
через 24 ч	0,98 (0,26)	1,49 (0,53)	<0,001*
через 48 ч	0,98 (0,31)	1,63 (0,54)	<0,001*
Urea, ммоль/л:			
исходно	6,20 (2,43)	6,49 (2,16)	0,196
через 24 ч	6,01 (2,39)	7,09 (2,51)	0,003*
через 48 ч	6,11 (2,05)	8,23 (2,40)	<0,001*
К, ммоль/л:			
исходно	4,38 (0,62)	4,33 (0,49)	0,815
через 24 ч	4,30 (0,52)	4,40 (0,48)	0,201
через 48 ч	4,34 (0,53)	4,78 (0,46)	<0,001*
sNGAL, нг/мл:			
исходно	157 (69)	137 (89)	0,026*
через 24 ч	178 (85)	269 (184)	<0,001*
ACR, мг/г:			
исходно	30 (16–59)	37 (17–107)	0,239
через 24 ч	41 (27–79)	66 (32–79)	0,162
через 48 ч	30 (14–80)	42 (14–95)	0,416
uCysC, мг/дл:			
исходно	3,61 (1,21)	3,61 (1,35)	0,185
через 24 ч	3,63 (1,20)	3,41 (1,20)	0,118
через 48 ч	3,38 (1,24)	3,26 (1,24)	0,347
uβ2-MG, мг/дл:			
исходно	2,59 (0,81)	2,39 (0,81)	0,185
через 24 ч	2,62 (0,97)	2,38 (0,95)	0,187
через 48 ч	2,67 (0,80)	2,62 (1,07)	0,531
uNGAL, нг/мл:			
исходно	23,5 (19,0)	31,27 (31,1)	0,339
через 24 ч	26,5 (27,4)	87,1 (65,5)	<0,001*

Примечание. Данные представлены в виде М (SD), Ме (25-й–75-й процентиль); *p* – вероятность ошибки для критерия  $\chi^2$  Пирсона и точного критерия Фишера для порядковых величин, для критерия Манна–Уитни для количественных величин в сравнении с показателями пациентов без КИН и с КИН; \* – статистически значимые различия показателей (*p* < 0,05). ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка.

в группе с КИН отмечался через 24 ч и имел тенденцию к уменьшению через 48 ч. Эти данные согласуются с результатами, полученными в работе [9].

В группе пациентов с КИН содержание  $s\beta 2$ -MG было выше, чем в группе сравнения [(1,23 (0,42) и 0,97 (0,25) мг/л соответственно,  $p < 0,001$ ], а его динамика была более выраженная. Уровни  $sNGAL$  несколько отличались в группах исходно, однако у пациентов с КИН наблюдалось резкое увеличение содержания  $sNGAL$  в плазме крови через 24 ч. В группе с КИН отмечалась закономерная динамика увеличения уровней мочевины и калия в плазме крови. Статистически значимых различий в исходном содержании  $uCysC$ ,  $u\beta 2$ -MG,  $uNGAL$  и соотношении альбумина к креатинину мочи ACR не выявлено. Это касается и динамики вышеуказанных биомаркеров через 24 и 48 ч. Согласно результатам исследования итальянских авторов, изучение уровня  $uNGAL$  показало отсутствие его значимой динамики [10]. Только в группе с КИН содержание  $uNGAL$  через 24 ч значительно выросло – от 31,3 (31,1) до 87,7 (65,5) нг/мл,  $p < 0,001$ . В связи с этим был проведен ROC-анализ для оценки предсказательной возможности изучаемых биомаркеров в отношении развития КИН.

Через 24 ч после введения РКС предикативная возможность использования  $sCysC$  в диагностике КИН была больше, чем Cr (рис. 1). Чувствительность и специфичность составили 75,68 и 76,72 % соответственно при пороговом значении  $sCysC > 1,064$  мг/л и не повышались через 48 ч. Полученные данные согласуются с результатами других исследовательских групп [11].

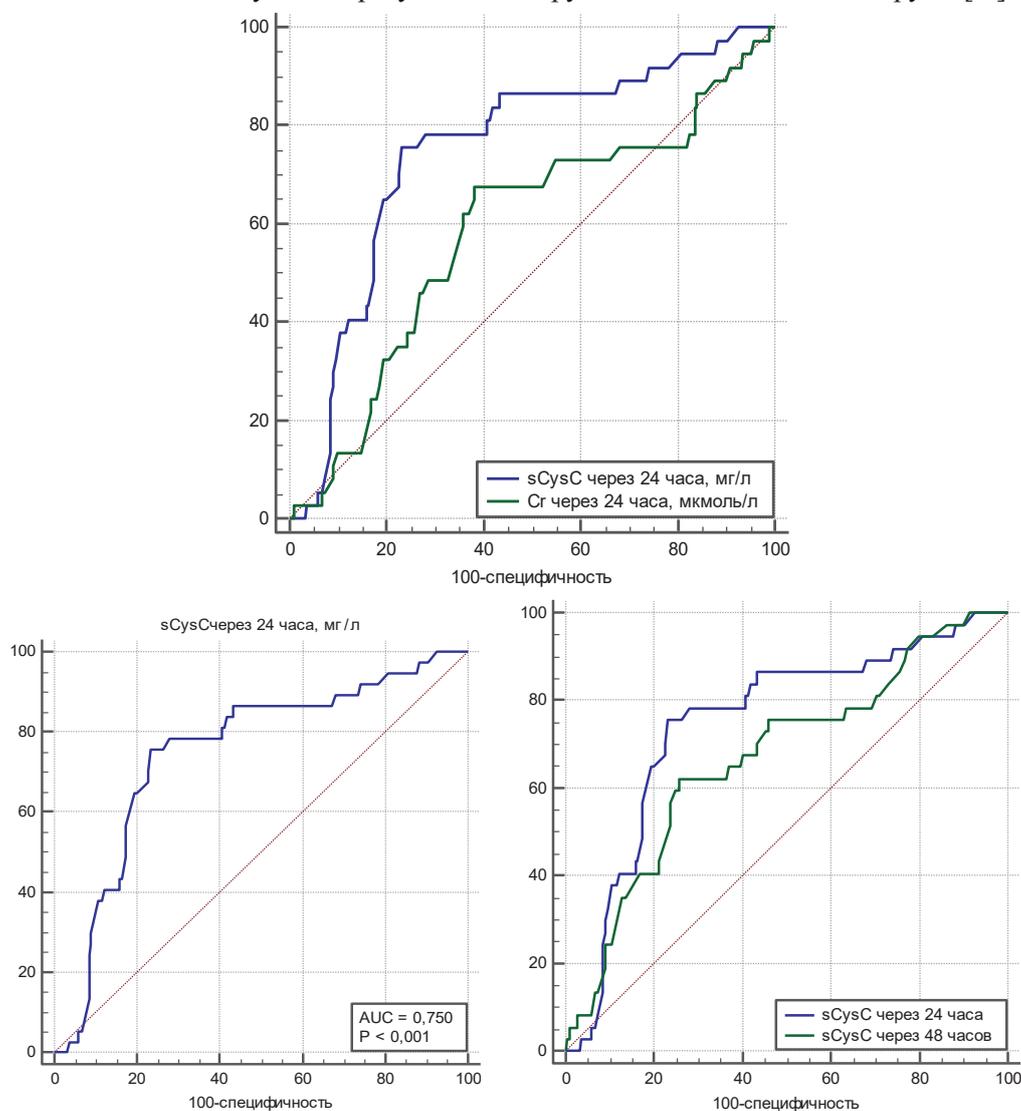


Рис. 1.  $sCysC$  в качестве предиктора КИН (сравнение с Cr)  
 Fig. 1.  $sCysC$  as a predictor of CIN (comparison with Cr)

ROC-анализ показал большую площадь под кривой для исходного  $s\beta 2$ -MG, а также при его динамике (рис. 2). Чувствительность и специфичность исходного  $s\beta 2$ -MG в качестве предиктора развития КИН составили 48,65 и 86,77 % соответственно при пороговом значении  $>1,1$  мг/л, а через 24 ч – 56,76 и 96,30 % при пороговом уровне  $s\beta 2$ -MG  $>1,42$  мг/л. Через 48 ч площадь под кривой увеличилась до 0,82 ( $p = 0,07$ ).

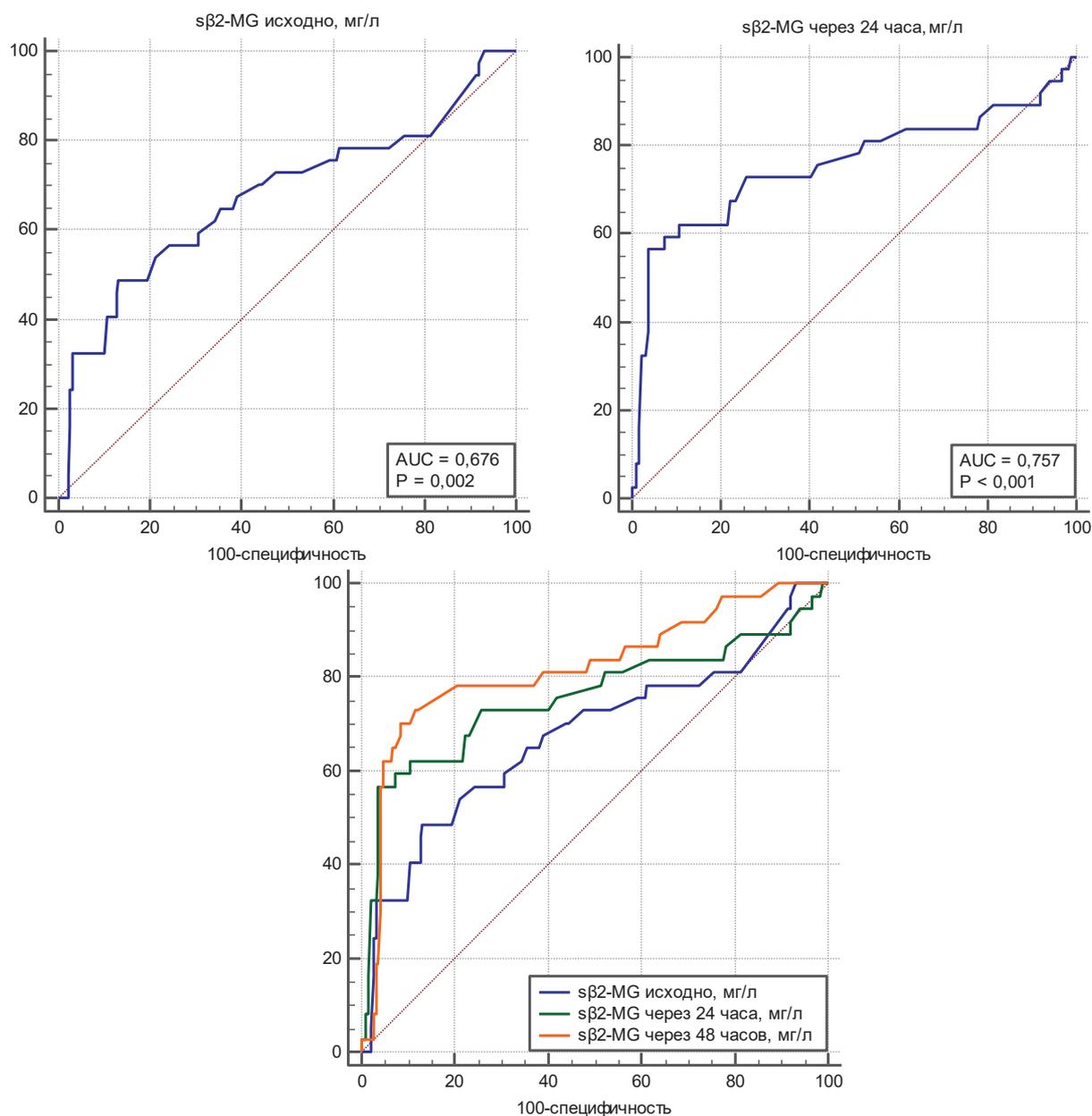


Рис. 2.  $s\beta 2$ -MG в качестве предиктора КИН

Fig. 2.  $s\beta 2$ -MG as a predictor of CIN

Чувствительность и специфичность  $s$ NGAL через 24 ч после введения РКС в качестве предиктора развития КИН составили 70,27 и 64,55 % соответственно при пороговом значении  $>194$  нг/мл (рис. 3).

Высокие чувствительность (81,08 %) и специфичность (91,53 %) показали повышение уровня  $u$ NGAL через 24 ч в моче при пороговом значении  $>38,35$  нг/мл (рис. 4). Корреляционная связь между этим параметром и развитием КИН оказалась сильной ( $r = 0,52$ ,  $p < 0,05$  для критерия Спирмена).

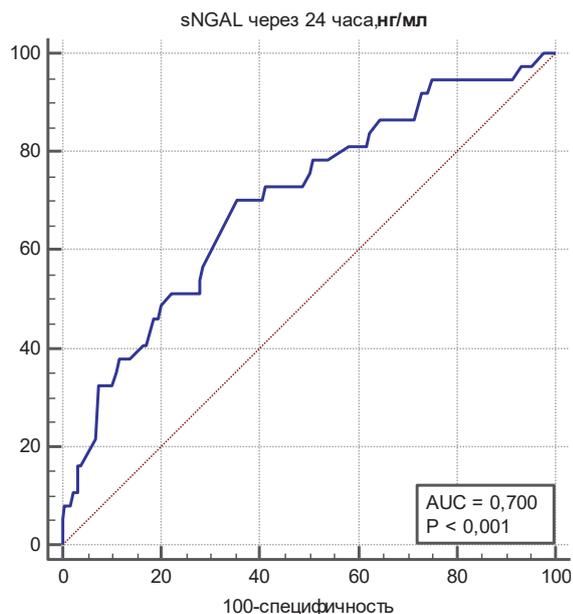


Рис. 3. sNGAL через 24 ч в качестве предиктора КИН  
Fig. 3. sNGAL 24 hours as a predictor of CIN

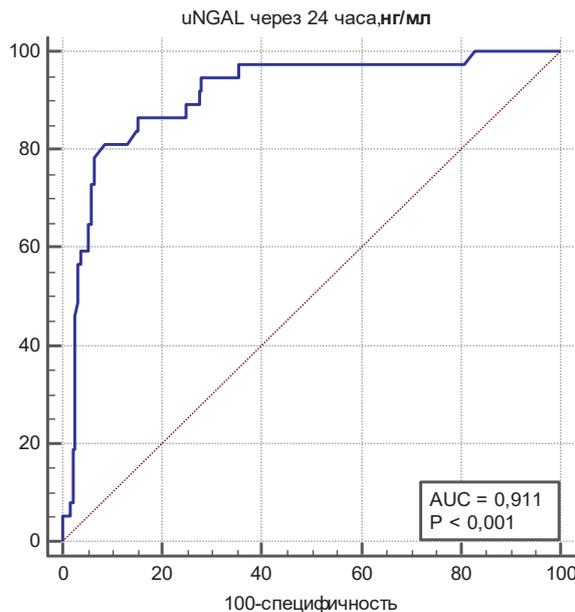


Рис. 4. uNGAL через 24 ч в качестве предиктора КИН  
Fig. 4. uNGAL 24 hours as a predictor of CIN

Развитие КИН ведет к увеличению сроков госпитализации, продлению временной нетрудоспособности и снижает показатель выживаемости пациентов (вследствие увеличения частоты повторных инфарктов миокарда и других неблагоприятных исходов) в течение 12 мес. после проведения процедуры. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода в подготовке пациента для проведения коронароангиографического исследования, поиска оптимальных путей кардиопротекции и нефропротекции с целью снижения частоты развития перипроцедурных осложнений, а также поиска эффективных методов ранней диагностики и лечения КИН.

Чаще всего диагностика КИН основана на динамике сывороточной концентрации Сг. Этот метаболит реагирует на повреждение почек с большим опозданием, а его уровень в крови зависит от таких факторов, не связанных с функцией почек, как пол, возраст, мышечная масса, используемое медикаментозное лечение, обезвоживание и статус питания. Динамика Сг не всегда адекватно отражает изменение СКФ (может быть недооценена), поскольку уровень Сг в крови

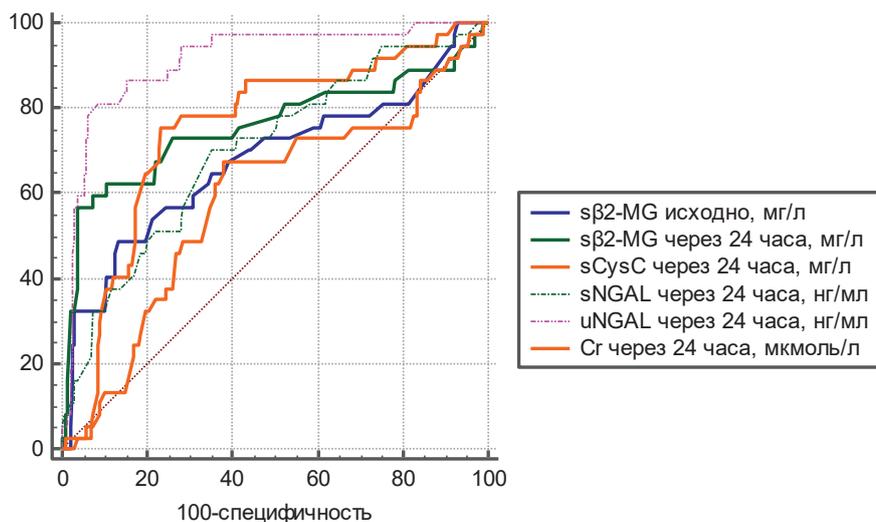


Рис. 5. Сравнение ROC-кривых выявленных предикторов КИН  
Fig. 5. Comparison of ROC-curves of detected CIN predictors

зависит от СКФ и его секреции в почечных канальцах. С другой стороны, при быстром снижении СКФ из-за развития ОПП канальцевая секреция Cr снижается, а Cr сыворотки распределяется по всему объему жидкости организма, что замедляет повышение концентрации Cr в крови. Между развитием ОПП и динамикой Cr существует 24–48-часовая задержка [2]. К этому времени в почках могут произойти необратимые изменения. Плазменные концентрации CysC зависят только от клубочковой фильтрации. Короткий период полужизни и полностью внеклеточное распределение способствуют быстрому росту его уровня в плазме крови при снижении экскреции.

Ранняя диагностика повреждений почек предельно важна, так как дает возможность быстро принять необходимые меры, снизить тяжесть КИН и улучшить показатель выживаемости пациентов [12–15].

### Выводы

1. Исходный уровень  $\beta$ 2-MG  $>1,1$  мг/л позволяет отнести пациентов к лицам с высоким риском развития КИН после выполнения КГР и ЧКВ, что требует более тщательной подготовки с целью минимизации риска.

2. При повышении через 24 ч уровней sCysC (на 25 % от исходного,  $>1,064$  мг/л) и  $\beta$ 2-микроглобулина ( $>1,42$  мг/л) в крови острое повреждение почек диагностируется раньше, чем по динамике Scr, что может быть использовано в рутинной клинической практике.

3. Быстрое определение uNGAL в моче позволяет диагностировать КИН уже в первые сутки после вмешательства, однако использование данного маркера в рутинной клинической практике затруднительно ввиду высокой стоимости реактивов и длительности аналитической процедуры.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список использованных источников

1. European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practice Guidelines on Acute Kidney Injury: Part 1: definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy / D. Fliser [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2012. – Vol. 27, N 12. – P. 4263–4272. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs375>
2. Haase-Fielitz, A. Instability of NGAL during long-term storage / A. Haase-Fielitz, M. Haase, R. Bellomo // *Am. J. Kidney Dis.* – 2009. – Vol. 53, N 3. – P. 564–565. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.01.009>
3. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker of acute renal injury after cardiac surgery / J. Mishra [et al.] // *Lancet.* – 2005. – Vol. 365, N 9466. – P. 1231–1238. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74811-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74811-X)
4. The outcome of acute renal failure in the intensive care unit according to RIFLE: model application, sensitivity, and predictability / N. Y. Abosaiif [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2005. – Vol. 46, N 6. – P. 1038–1048. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.08.033>
5. GFR Calculator [Electronic resource] // National Kidney Foundation. – 2015. – Mode of access : [http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/gfr\\_calculator.cfm](http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/gfr_calculator.cfm). – Date of access : 01.12.2018.
6. A simple risk score for prediction contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention: development and initial validation / R. Mehran [et al.] // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2004. – Vol. 44, N 7. – P. 1393–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.06.068>
7. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization / F.-J. Neumann [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2019. – Vol. 40, N 2. – P. 87–165. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy394>
8. Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines / F. Stacul [et al.] // *Eur. Radiol.* – 2011. – Vol. 21, N 12. – P. 2527–2541. <https://doi.org/10.1007/s00330-011-2225-0>
9. Significance of cystatin C for early diagnosis of contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary angiography / M. Wang [et al.] // *Med. Sci. Monit.* – 2016. – Vol. 22. – P. 2956–2961. <https://doi.org/10.12659/msm.897241>
10. Cystatin C, but not urinary or serum NGAL, may be associated with contrast induced nephropathy after percutaneous coronary invasive procedures: a single center experience on a limited number of patients / E. Cecchi [et al.] // *Acta. Medica. Academica.* – 2017. – Vol. 46, N 1. – P. 34–43. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.184>
11. Diagnostic accuracy of serum cystatin C for early recognition of contrast induced nephropathy in Western Indians undergoing catheterization / A. N. Shukla [et al.] // *Indian Heart J.* – 2017. – Vol. 69, N 3. – P. 311–315. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2016.12.010>
12. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes prerenal from in trans renal failure and predict outcomes / E. Singer [et al.] // *Kidney Int.* – 2011. – Vol. 80, N 4. – P. 405–414. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.41>

13. Nozue, T. Predictive value of serum cystatin C,  $\beta$ 2-microglobulin, and urinary liver-type fatty acid-binding protein on the development of contrast-induced nephropathy / T. Nozue, I. Michishita, I. Mizuguchi // *Cardiovasc. Interv. Ther.* – 2010. – Vol. 25, N 2. – P. 85–90. <https://doi.org/10.1007/s12928-010-0014-3>
14. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early marker of contrast-induced nephropathy after elective invasive cardiac procedures / N. Kafkas [et al.] // *Clin. Cardiol.* – 2016. – Vol. 39, N 8. – P. 464–470. <https://doi.org/10.1002/clc.22551>
15. Biomarker response to contrast administration in diabetic and nondiabetic patients following coronary angiography / V. L. Ashalatha [et al.] // *Indian J. Nephrol.* – 2017. – Vol. 27, N 1. – P. 20–27. <https://doi.org/10.4103/0971-4065.179335>

## References

1. Fliser D., Laville M., Covic A., Fouque D., Vanholder R., Juillard L., Van Biesen W. European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practice Guidelines on Acute Kidney Injury: Part 1: definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2012, vol. 27, no. 12, pp. 4263–4272. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs375>
2. Haase-Fielitz A., Haase M., Bellomo R. Instability of NGAL during long-term storage. *American Journal of Kidney Diseases*, 2009, vol. 53, no. 3, pp. 564–565. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.01.009>
3. Mishra J., Dent C., Tarabishi R., Mitsnefes M. M., Ma Q., Kelly C. [et al.]. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker of acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*, 2005, vol. 365, no. 9466, pp.1231–1238. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74811-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74811-X)
4. Abosaif N. Y., Tolba Y. A., Heap M., Russell J., El Nahas A. M. The outcome of acute renal failure in the intensive care unit according to RIFLE: model application, sensitivity, and predictability. *American Journal of Kidney Diseases*, 2005, vol. 46, no. 6, pp. 1038–1048. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.08.033>
5. GFR Calculator. *National Kidney Foundation*. Available at: [http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/gfr\\_calculator.cfm](http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/gfr_calculator.cfm) (accessed 01.12.2018).
6. Mehran R., Aymong E. D., Nikolsky E., Lasic Z., Iakovou I., Fahy M. [et al.]. A simple risk score for prediction contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention: development and initial validation. *Journal of the American College of Cardiology*, 2004, vol. 44, no. 7, pp. 1393–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.06.068>
7. Neumann F.-J., Sousa-Uva M., Ahlsson A., Alfonso F., Banning A. P., Benedetto U. [et al.]. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *European Heart Journal*, 2019, vol. 40, no. 2, pp. 87–165. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy394>
8. Stacul F., Van der Molen A. J., Reimer P., Webb J. A., Thomsen H. S., Morcos S. K. [et al.]. Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines. *European Radiology*, 2011, vol. 21, no. 12, pp. 2527–2541. <https://doi.org/10.1007/s00330-011-2225-0>
9. Wang M., Zhang L., Yue R., You G., Zeng R. Significance of cystatin C for early diagnosis of contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary angiography. *Medical Science Monitor*, 2016, vol. 22, pp. 2956–2961. <https://doi.org/10.12659/msm.897241>
10. Cecchi E., Avveduto G., D'Alfonso M. G., Terreni A., Gelera E., Caldini A., Giglioli C. Cystatin C, but not urinary or serum NGAL, may be associated with contrast induced nephropathy after percutaneous coronary invasive procedures: a single center experience on a limited number of patients. *Acta Medica Academica*, 2017, vol. 46, no. 1, pp. 34–43. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.184>
11. Shukla A. N., Juneja M., Patel H., Shah K. H., Konat A., Thakkar B. M., Madan T., Prajapati J. Diagnostic accuracy of serum cystatin C for early recognition of contrast induced nephropathy in Western Indians undergoing catheterization. *Indian Heart Journal*, 2017, vol. 69, no. 3, pp. 311–315. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2016.12.010>
12. Singer E., Elger A., Elitok S., Kettritz R., Nickolas T. L., Barasch J., Luft F. C., Schmidt-Ott K. M. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes prerenal from in trans renal failure and predict outcomes. *Kidney International*, 2011, vol. 80, no. 4, pp. 405–414. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.41>
13. Nozue T., Michishita I., Mizuguchi I. Predictive value of serum cystatin C,  $\beta$ 2-microglobulin, and urinary liver-type fatty acid-binding protein on the development of contrast-induced nephropathy. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics*, 2010, vol. 25, no. 2, pp. 85–90. <https://doi.org/10.1007/s12928-010-0014-3>
14. Kafkas N., Liakos C., Zoubouloglou F., Dagadaki O., Dragasis S., Makris K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early marker of contrast-induced nephropathy after elective invasive cardiac procedures. *Clinical Cardiology*, 2016, vol. 39, no. 8, pp. 464–470. <https://doi.org/10.1002/clc.22551>
15. Ashalatha V. L., Bitla A. R., Kumar V. S., Rajasekhar D., Suchitra M. M., Lakshmi A. Y., Rao P. V. Biomarker response to contrast administration in diabetic and nondiabetic patients following coronary angiography. *Indian Journal of Nephrology*, 2017, vol. 27, no. 1, pp. 20–27. <https://doi.org/10.4103/0971-4065.179335>

## Информация об авторах

*Пырочкин Александр Владимирович* – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: morbid\_ru@mail.ru

*Пристром Андрей Марьянович* – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

*Пилотович Валерий Станиславович* – д-р мед. наук, профессор. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

*Горецкая Данара Николаевна* – врач-анестезиолог-реаниматолог, науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

*Юрага Тамара Михайловна* – ст. науч. сотрудник, руководитель отдела. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

*Борисенко Татьяна Дмитриевна* – канд. мед. наук, заведующий отделением. 1-я городская клиническая больница (пр. Независимости, 64, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

*Воробьева Елизавета Александровна* – мл. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: eli.mur@mail.ru

*Соловей Ольга Михайловна* – ст. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: solo\_som@mail.ru

*Черноглаз Павел Феликсович* – заведующий ангиографическим кабинетом, ассистент кафедры. Республиканский научно-практический центр детской хирургии (пр. Независимости, 64, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

*Веселов Владимир Владимирович* – заведующий ангиографическим кабинетом. 1-я городская клиническая больница (пр. Независимости, 64, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

*Лушников Инна Евгеньевна* – заведующий отделением. 1-я городская клиническая больница (пр. Независимости, 64, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

*Пискунов Сергей Евгеньевич* – заведующий отделением. 1-я городская клиническая больница (пр. Независимости, 64, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

## Information about the authors

*Alexander V. Pyrochkin* – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: morbid\_ru@mail.ru

*Andrey M. Prystrom* – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

*Valery S. Pilotovich* – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

*Danara N. Horetskaya* – Anesthesiologist, Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

*Tamara M. Yuraga* – Senior researcher, Head of the Department. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

*Tatyana D. Borisenko* – Ph. D. (Med.), Head of the Department. 1st Minsk City Clinical Hospital (64, Nezavisimosti Ave., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

*Elisaveta A. Varabyova* – Junior researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: eli.mur@mail.ru

*Olga M. Solovey* – Senior researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: solo\_som@mail.ru

*Pavel F. Chernoglaz* – Head of the catheterization laboratory, Assistant professor. Children's Surgery National Research Hospital (64, Nezavisimosti Ave., 220013, Minsk, Republic of Belarus). Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

*Vladimir V. Veselov* – Head of the catheterization laboratory. 1st Minsk City Clinical Hospital (64, Nezavisimosti Ave., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

*Inna E. Lushnikova* – Head of the Department. 1st Minsk City Clinical Hospital (64, Nezavisimosti Ave., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

*Sergey E. Piskunov* – Head of the Department. 1st Minsk City Clinical Hospital (64, Nezavisimosti Ave., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

ISSN 1814-6023 (Print)  
ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.441.577.112  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-185-191>

Поступила в редакцию 12.01.2019  
Received 12.01.2019

Ю. Е. Разводовский<sup>1</sup>, В. Ю. Смирнов<sup>1</sup>, Н. Е. Максимович<sup>1</sup>, И. Н. Семененя<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Республика Беларусь

## ПУЛ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ У КРЫС ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ СИНТЕЗА МОНООКСИДА АЗОТА МЕТИЛОВЫМ ЭФИРОМ N-НИТРО-L-АРГИНИНА (L-NAME)

**Аннотация.** Инсульт является одной из основных причин инвалидности и смертности населения во многих странах мира. Механизмы развития ишемического инсульта сложны и до конца не исследованы.

Цель работы – изучение изменений пула свободных аминокислот и их метаболитов в плазме крови крыс при субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) на фоне введения N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME).

Эксперимент выполнен на 18 белых беспородных крысах-самках. СИГМ моделировали у 12 крыс путем перевязки обеих общих сонных артерий в течение 1 ч. L-NAME вводили 6 животным внутривенно в дозе 5 мг/кг непосредственно перед перевязкой сонных артерий. Содержание аминокислот и их дериватов в экстрактах плазмы крови определяли методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Установлено, что СИГМ индуцировал аминокислотный дисбаланс плазмы крови, проявлением которого было повышение уровней целого ряда соединений. Предварительное введение L-NAME частично предотвращало развитие аминокислотного дисбаланса плазмы крови при СИГМ.

**Ключевые слова:** аминокислоты, плазма крови, субтотальная ишемия головного мозга

**Для цитирования:** Пул свободных аминокислот плазмы крови у крыс при субтотальной ишемии головного мозга в условиях блокады синтеза монооксида азота метиловым эфиром N-нитро-L-аргинина (L-NAME) / Ю. Е. Разводовский [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 185–191. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-185-191>

Y. E. Razvodovsky<sup>1</sup>, V. Y. Smirnov<sup>1</sup>, N. Ye. Maksimovich<sup>1</sup>, I. N. Semeneya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

## POOL OF FREE AMINO ACIDS IN THE BLOOD PLASMA OF RATS UNDERGOING SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA AFTER L-NAME ADMINISTRATION

**Abstract.** A stroke is one of the leading causes of morbidity, disability and mortality in many countries. Mechanisms of development of ischemic stroke are complex and have not been fully established.

The aim of this study was to estimate the changes in the pool of free amino acids and their derivatives in the plasma of rats undergoing subtotal cerebral ischemia (SCI) and treated with L-NAME.

Experiment was made on 18 rats: 12 animals were undergoing bilateral filament occlusion of arteries carotid, 6 of them were treated with L-NAME. The analyses of free amino acids levels in the blood plasma extracts were carried out by reversed-phase HPLC. Concentrations of several amino acids were elevated after 1 hour of ischemia, including aspartate, asparagine, glutamine, glycine, alanine, taurine, phenylalanine, histidine, 3-methylhistidine, treonine, citrulline, ornithine, as well as branched-chain amino acids.

Administration of L-NAME partially prevented the imbalance of the amino acids pool caused by SCI. Preventive injection of L-NAME alleviated the imbalance in the pool of free amino acids of blood plasma caused by SCI.

**Keywords:** amino acids, blood plasma, subtotal cerebral ischemia

**For citation:** Razvodovsky Y. E., Smirnov V. Y., Maksimovich N. Ye., Semeneya I. N. Pool of free amino acids in the blood plasma of rats undergoing subtotal cerebral ischemia after L-name administration. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 185–191 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-185-191>

**Введение.** Инсульт является одной из основных причин инвалидности и смертности населения во многих странах мира [1–3]. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире от инсульта умирают более 6,5 млн человек [4]. В этой связи разработка методов профилактики и лечения инсульта является актуальным направлением исследований.

Механизмы развития ишемического инсульта сложны и до конца не изучены. В патогенезе ишемического инсульта выделяют так называемые стадии биохимического каскада, включающие энергодефицит, глутаматную и аспартатную эксайтотоксичность, окислительный стресс, воспаление, апоптоз [5–7]. Эти сведения в последнее время дополнены представлениями об участии монооксида азота (NO) в реализации повреждений головного мозга при его ишемии [8]. Оксид азота является многофункциональным биологическим медиатором, играющим важную роль в поддержании гомеостаза, включая участие в передаче сигнала, контроле гемодинамики, регуляции клеточной пролиферации, процессах воспаления и свободнорадикального окисления [9].

Моделирование дефицита оксида азота с помощью блокатора его синтеза N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME) приводит к развитию артериальной гипертензии, гипертрофии кардиомиоцитов, увеличению коэффициента эндотелиальной дисфункции [10]. На основе экспериментальных исследований, проведенных с использованием селективных и неселективных ингибиторов различных изоформ NO-синтазы, установлена неоднозначная роль NO различного происхождения в реализации повреждающих (прооксидантных, протромботических, провоспалительных и др.) и защитных (антиоксидантных, антитромботических, противовоспалительных и др.) механизмов при ишемических повреждениях головного мозга [8, 11].

Одним из направлений детализации патогенетических механизмов ишемического инсульта является изучение изменений аминокислотного фонда плазмы крови [12]. В предыдущих исследованиях была показана прогностическая значимость изменения уровня нейроактивных аминокислот в плазме крови у пациентов с острым ишемическим инсультом [13].

Цель исследования – характеристика изменений пула аминокислот и их метаболитов в плазме крови крыс при субтотальной ишемии головного мозга на фоне ведения L-NAME.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты выполнены на 18 белых беспородных крысах-самках (по 6 животных в каждой группе) массой 180–220 г. Крысам опытных групп моделировали субтотальную ишемию головного мозга (СИГМ) путем перевязки обеих общих сонных артерий в течение 1 ч. Препарат L-NAME вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг непосредственно перед перевязкой общих сонных артерий. Контрольную группу составили ложнопериоперированные животные, получавшие эквивалентное количество изотонического раствора NaCl. Все оперативные манипуляции проводили в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (60 мг/кг).

После декапитации животных кровь немедленно собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали 15 мин при 3000 g. К полученной плазме добавляли равный объем среды, содержащей 1М хлорную кислоту, ЭДТА (25 мг/л) и  $\delta$ -аминовалериановую кислоту (250 мкмоль/л). После центрифугирования (15 мин при 13 000 g и +4 °C) сразу же производили отбор полученного супернатанта.

Спектр определяемых соединений включал протеиногенные аминокислоты, орнитин, цитруллин и ряд родственных соединений (таурин,  $\alpha$ -аминобутират и др.). Анализ проводили на хроматографе Agilent 1100 методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой в Na-боратном буфере [14, 15]. Фотометрическое детектирование выполняли на длине волны 338 нм. Использовались колонка Zorbax Eclipse Plus C18, 3,5 мкм, 2,1×150 мм, подвижные фазы А и D (0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 6,25 и 5,75 соответственно, с добавлением 20 мг/л ЭДТА и азида Na), подвижные фазы В и С (60 %-ные водные растворы ацетонитрила и метанола). Разделение проводили путем градиентного элюирования за 78 мин при температуре колонки 34 °C. Для идентификации и количественного анализа использовали программу Agilent ChemStation B.04.01[481]. Калибровку метода осуществляли с применением стандартной смеси аминокислот фирмы Sigma-Aldridge. В работе использовали реактивы квалификации не ниже хч. Тридистиллированную воду для подвижных фаз пропускали через патрон Norganic (Millipore, США), растворы фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы R. В случае выполнения условий применимости (нормальность выборок и гомогенность дисперсий) применяли пара-

метрический дисперсионный анализ с поправкой Тьюки на множественность сравнений (данные для этих переменных представлены в таблицах в виде среднего  $\pm$  стандартной ошибки среднего). В случае невыполнения этих условий применяли непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса с поправкой Беньямини–Хохберга на множественность сравнений (в таблицах для этих переменных приведены значения медианы и квартилей). Использовали также корреляционный и линейный дискриминантный анализ.

**Результаты и их обсуждение.** Субтотальная ишемия головного мозга индуцировала аминокислотный дисбаланс плазмы крови, проявлением которого было повышение уровней целого ряда соединений, в том числе аспартата, аспарагина, глутамина, глицина, аланина, таурина, фенилаланина, гистидина, 3-метилгистидина, треонина, цитруллина,  $\beta$ -аланина, орнитина, а также аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ) (табл. 1, 2). Изменения касались в основном гликогенных аминокислот (аспартата, аспарагина, глутамина, глицина, аланина и др.), однако увеличения соотношения гликогенных и кетогенных аминокислот не наблюдалось вследствие более чем двукратного повышения уровня лейцина. Несмотря на рост уровней соединений, играющих роль тормозных нейромедиаторов в ЦНС (глицин, таурин), соотношение сумм

Таблица 1. Концентрация аминокислот и их производных в плазме крови крыс при субтотальной ишемии головного мозга на фоне введения L-NAME, мкмоль/л

Table 1. Concentration of amino acids and their derivatives in the plasma of rats undergoing subtotal cerebral ischemia treated with L-NAME,  $\mu\text{mol/l}$

Аминокислота	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-NAME
Аспартат	20,8 $\pm$ 2,56	45,8 $\pm$ 7,15*	31,6 $\pm$ 2,46
Глутамат	155 $\pm$ 24,2	228 $\pm$ 36,9	236 $\pm$ 14*
Аспарагин	63,1 $\pm$ 6,06	97,4 $\pm$ 8,94*	93 $\pm$ 6,61*
Серин	202 $\pm$ 27,1	298 $\pm$ 37,7	286 $\pm$ 28
Глутамин	404 $\pm$ 68,5	907 $\pm$ 111*	993 $\pm$ 74*
Гистидин	63,7 $\pm$ 7,17	113 $\pm$ 10,7*	120 $\pm$ 8,84*
Гомосерин	12,5 $\pm$ 0,897	11,9 $\pm$ 0,915	15,9 $\pm$ 1,02†
3-Метилгистидин	10,1 $\pm$ 1,27	26,1 $\pm$ 3,1*	17 $\pm$ 2,42†
Глицин	252 (185/324)	417 (334/545)	275 (264/396)
Фосфоэтаноламин	12 $\pm$ 0,895	12,8 $\pm$ 1,06	15,6 $\pm$ 1,21
Треонин	137 $\pm$ 14,6	252 $\pm$ 21,9*	79,6 $\pm$ 11†
1-Метилгистидин	5,48 (4,06/8,58)	5,49 (4,02/6,78)	4,86 (4,17/5,76)
Цитруллин	60,7 $\pm$ 7,87	125 $\pm$ 14,5*	133 $\pm$ 13,1*
Аргинин	86,9 (44,9/89,6)	24,2 (3,94/79,5)	32,4 (21,8/105)
Ансерин	7,74 (4,22/10,1)	11,5 (9,46/17,9)	7,82 (6,83/9,32)
$\beta$ -Аланин	5,61 (5,34/5,72)	7,84 (6,74/25,6)*	7,52 (6,91/7,56)*
Карнозин	8,99 $\pm$ 1,4	7,94 $\pm$ 1,12	5,61 $\pm$ 1,01
Аланин	421 (362/462)	967 (769/1140)*	898 (797/1070)*
Таурин	280 $\pm$ 25,8	468 $\pm$ 58,1*	288 $\pm$ 13,8†
Гамма-аминомасляная кислота	7,27 (5,05/9,71)	5,89 (5,67/6,17)	9,4 (8,06/10,8)†
Тирозин	54,8 $\pm$ 5,14	73,6 $\pm$ 8,07	46 $\pm$ 7,28†
$\alpha$ -Аминобутират	12,4 $\pm$ 2,13	13,3 $\pm$ 1,79	41,2 $\pm$ 4,12**†
Этаноламин	20 (17,1/22,6)	38,3 (26,3/46,5)*	19,7 (18,1/21)†
Валин	106 $\pm$ 8,95	223 $\pm$ 22,4*	174 $\pm$ 21,8
Метионин	31,1 $\pm$ 4,3	47,9 $\pm$ 4,39*	28,5 $\pm$ 3,1†
Триптофан	44,3 (40,2/51,2)	37,5 (33/42,2)	45,5 (30,6/51,2)
Фенилаланин	50,8 $\pm$ 4,08	95 $\pm$ 10,9*	70,6 $\pm$ 5,57
Изолейцин	49,6 $\pm$ 4,23	117 $\pm$ 13,5*	73,5 $\pm$ 10,1†
Лейцин	80,5 $\pm$ 6,08	187 $\pm$ 22,7*	142 $\pm$ 18,2
Орнитин	59,8 (47,8/85)	130 (108/148)*	79,5 (55,2/101)
Лизин	235 (145/318)	317 (281/359)	111 (97/128)†

Примечание. Достоверность различий ( $p < 0,05$ ): \* – при сравнении с контролем; † – при сравнении с СИГМ. То же в табл. 2.

возбуждающих и тормозных соединений в плазме крови не изменялось (табл. 2). К эффектам СИГМ можно отнести повышение суммарного пула протеиногенных аминокислот, а также соотношения АРУЦ и ароматических аминокислот (ААК) (табл. 2).

Введение L-NAME предотвращало ряд проявлений аминокислотного дисбаланса, индуцируемого СИГМ, в том числе повышение уровней аспартата, таурина, треонина, валина, изолейцина, 3-метилгистидина, метионина, орнитина и фенилаланина (см. табл. 1). Наиболее выраженный корригирующий эффект введения L-NAME наблюдался в отношении уровней 3-метилгистидина, метионина, треонина, изолейцина и таурина, уровни которых не только перестали отличаться от контрольных значений, но и снизились по отношению к таковым в группе СИГМ. В то же время уровни аланина,  $\beta$ -аланина и цитруллина сохранялись выше нормы, наблюдалось повышение концентрации  $\alpha$ -аминомасляной кислоты, увеличение соотношений гликогенных/кетогенных и заменимых/незаменимых аминокислот (табл. 2). Введение L-NAME не оказывало влияния на соотношение АРУЦ и ААК, которое сохранялось увеличенным (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Интегральные показатели аминокислотного фонда плазмы крови крыс при субтотальной ишемии ГМ на фоне введения L-NAME

Table 2. Integral indices of amino acids pool of the rats undergoing subtotal cerebral ischemia treated with L-NAME

Аминокислоты и их соотношение	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-NAME
ААК	157 ± 16,3	206 ± 19,6	161 ± 17,2
АРУЦ	250 (216/271)	544 (414/665)*	371 (307/396)*
Заменимые	1530 (1350/1850)	2960 (2440/3480)*	2720 (2630/3260)*
Незаменимые	803 (684/956)	1530 (1160/1600)*	827 (684/866)†
Гликогенные	1940 ± 243	3770 ± 492*	3370 ± 278*
Кетогенные	317 (198/410)	511 (466/559)*	249 (210/264)†
Нейротрансмиттерные	706 ± 78,3	1200 ± 175*	882 ± 53,7
Возбуждающие	170 (155/200)	256 (219/290)	252 (242/310)
Тормозные	530 ± 56,8	924 ± 135*	614 ± 40
АРУЦ/ААК	1,54 (1,41/1,7)	2,62 (2,37/2,83)*	2,33 (2,21/2,69)*
Заменимые/незаменимые	1,69 (1,65/1,93)	2,06 (1,81/2,12)	3,43 (3,06/4,1)**
Гликогенные/кетогенные	5,42 (4,98/5,93)	6,73 (5,23/7,61)	12,7 (11,7/15,3)**
Возбуждающие/тормозные	0,30 (0,284/0,341)	0,303 (0,263/0,315)	0,427 (0,425/0,449)†
Суммарный пул протеиногенных аминокислот	2470 (2140/2800)	4540 (3590/5120)*	3580 (3240/4060)*

Определенный интерес представляют результаты анализа изменений корреляционного поля изучаемых показателей. В контрольной группе ложнооперированных животных наблюдалось преобладание положительных корреляций (отрицательно коррелировали с остальными соединениями только  $\beta$ -аланин и карнозин). При СИГМ происходило нарушение корреляционных связей между пулом аминокислот и уровнями фосфоэтаноламина, треонина, l-метилгистидина, цитруллина, аргинина, лизина,  $\beta$ -аланина и карнозина, а также возникновение отрицательных корреляций с 3-метилгистидином и гомосерином. Введение L-NAME предотвращало исчезновение положительных связей с остальным пулом треонина, l-метилгистидина, цитруллина, аргинина, лизина и ослабляло связи с 3-метилгистидином, гомосерином и гамма-аминомасляной кислотой. Таким образом, дисбаланс пула аминокислот плазмы крови при СИГМ сопровождается нарушением внутренних взаимосвязей пула, что может объясняться изменением транспорта и доступности перечисленных соединений в тканях. Введение L-NAME частично предотвращало эти нарушения.

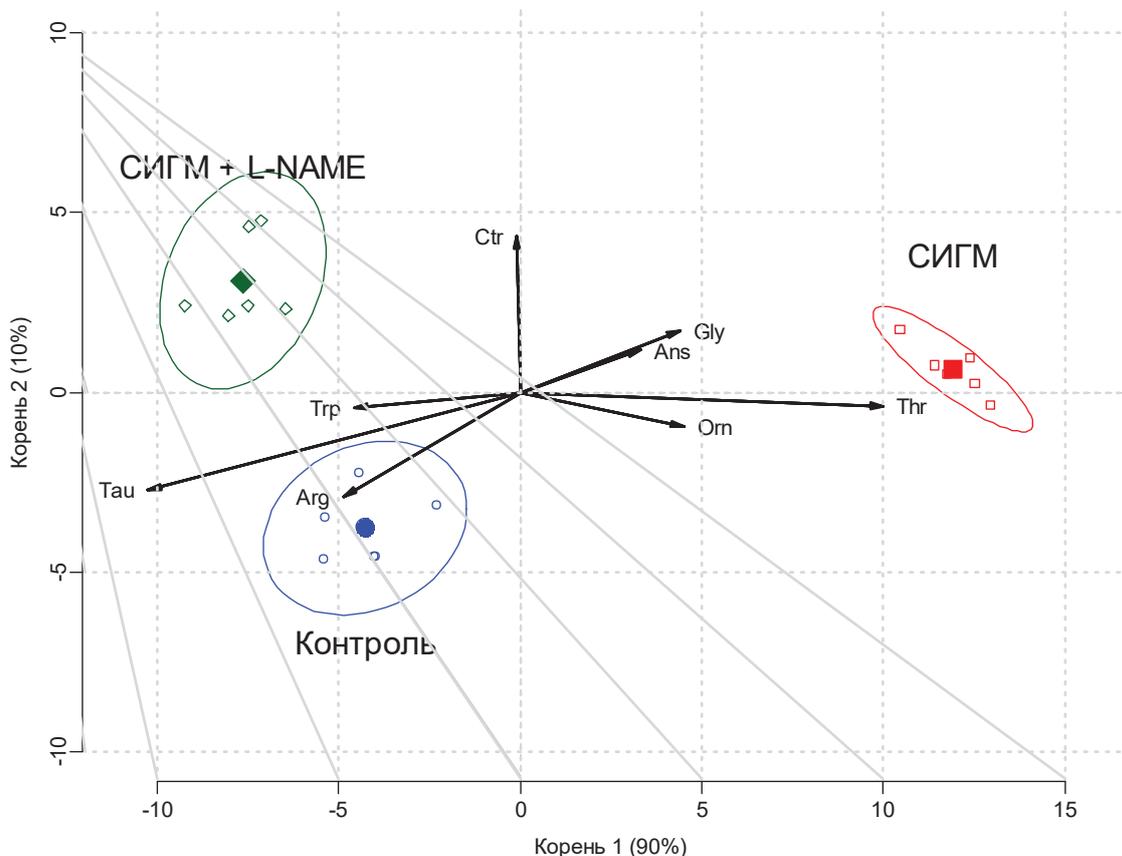
Наиболее значимыми показателями, характеризующими изменения пула свободных аминокислот и родственных соединений плазмы крови в данной экспериментальной модели, являлись треонин, аргинин, ансерин, цитруллин, орнитин, триптофан, таурин и глицин (табл. 3). Последние три аминокислоты являются нейроактивными, поэтому изменение их уровней, скорее всего, связано с эффектом СИГМ. Изменение уровней цитруллина и орнитина свидетельствует об определенном влиянии СИГМ на цикл мочевины. Достаточно высокой значимостью обладают уровень ансерина (нейромодулятор) в ЦНС и концентрация аргинина (донор NO).

Т а б л и ц а 3. Анализ дискриминантных функций  
 T a b l e 3. Analysis of discriminant functions

Аминокислота	Лямбда Уилкса	Частичная лямбда Уилкса	F-исключения (2,8)	p	Толерантность
Треонин	0,0306	0,0345	111,9	0,000001	0,0391
Цитруллин	0,00643	0,164	20,4	0,000723	0,110
Аргинин	0,00711	0,148	22,9	0,000486	0,252
Ансерин	0,00452	0,234	13,1	0,00297	0,195
Триптофан	0,00553	0,191	17,0	0,00132	0,155
Таурин	0,00472	0,223	13,9	0,00249	0,0281
Орнитин	0,00245	0,430	5,29	0,0343	0,109
Глицин	0,00189	0,557	3,18	0,0965	0,0812

П р и м е ч а н и е. Лямбда Уилкса модели = 0,00105; прилб.  $F(16,16) = 29,79; p = 6,49 \cdot 10^{-9}$ .

Нормализующий эффект введения L-NAME в отношении ряда компонентов аминокислотного пула плазмы крови подтверждается каноническим анализом. Расстояние Махаланобиса между центрами групп контроля и СИГМ значительно больше, чем таковое между контролем и группой введения L-NAME (см. рисунок), причем различия между этими расстояниями еще более контрастны при измерении вдоль первой главной компоненты (объясняющей более 90 % общей вариативности). Максимальный вклад в структуру этой компоненты вносили треонин, таурин, менее значительный – аргинин, триптофан, орнитин, глицин и ансерин (о чем можно судить по абсолютной величине проекции канонических переменных на ось абсцисс), что, скорее всего, свидетельствует о нормализации пулов этих показателей. В то же время наибольший вклад в структуру второй главной компоненты вносила концентрация цитруллина, уровень ко-



Расположение канонических значений на плоскости двух главных компонент и векторы стандартизированных канонических переменных

Arrangement of the canonical values on the plane of 2 main components and the vectors of standardized canonical variables

того оставался выше контрольных значений (см. табл. 1). Следует подчеркнуть, что нормализация касалась лишь наиболее значимых компонентов пула аминокислот и их производных, о чем свидетельствует в том числе остающееся выше контрольных значений суммарное содержание исследуемых соединений, включая пул протеиногенных аминокислот (табл. 2).

### Выводы

1. Субтотальная ишемия головного мозга крыс индуцирует выраженный аминокислотный дисбаланс плазмы крови, проявляющийся в повышении концентрации ряда гликогенных аминокислот, лейцина и таурина.

2. Предварительное введение L-NAME снижает выраженность аминокислотного дисбаланса плазмы крови при субтотальной ишемии головного мозга и предотвращает нарушение ряда положительных корреляционных связей внутри пула аминокислот и родственных соединений плазмы крови.

3. Нормализация пула свободных аминокислот и их производных в плазме крови при введении L-NAME происходит в отношении наиболее значимых его компонентов – таурина, триптофана, глицина, орнитина, ансерина и аргинина.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список использованных источников

1. Разводовский, Ю. Е. Потребление алкоголя и смертность от инсульта в Беларуси / Ю. Е. Разводовский // *Вопр. наркологии*. – 2009. – № 6. – С. 82–92.
2. Долгосрочные исходы мозгового инсульта в крупной городской популяции Беларуси / С. Д. Кулеш [и др.] // *Вестн. ВГМУ*. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 93–101.
3. Maksimovich, Ye. N. Epidemiology of ischemic strokes in the Grodno region (Belarus) / Ye. N. Maksimovich, T. P. Pronko, N. Ye. Maksimovich // *24 European Stroke Conference (Vienna, May 13–15, 2015)*. – Vienna, 2015. – P. 178.
4. Гусев, Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М. : Медицина, 2001. – 327 с.
5. Maksimovich, N. Ye. Tolerance of hypoxic hypoxia in rats with cerebral ischemia treated by NO-synthase modulators / N. Ye. Maksimovich // *Hypoxia Med.* – 2004. – Vol. 12, N 1–2. – P. 20–23.
6. Кулеш, С. Д. Патогенез ишемического инсульта: Биохимические механизмы и роль нейроактивных аминокислот / С. Д. Кулеш // *Мед. новости*. – 1998. – № 1. – С. 21–24.
7. Zablocka, B. Enhancement of  $^3\text{H}$ D-aspartate release during ischemia like conditions in rat hippocampal slices: source of excitatory amino acids / B. Zablocka, K. Domańska-Janik // *Acta Neurobiol. Exp.* – 1996. – Vol. 56, N 1. – P. 63–70.
8. Максимович, Н. Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга / Н. Е. Максимович. – Гродно : ГрГМУ, 2004. – 180 с.
9. Moncada, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Moncada, R. Palmer, E. Higgs // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – Vol. 43, N 2. – P. 109–142.
10. Исследование эндотелиопротективных эффектов лекарственных средств различных групп на модели L-NAME индуцированного дефицита оксида азота / М. В. Покровский [и др.] // *Вестн. Волгоград. гос. мед. ун-та*. – 2010. – № 3. – С. 52–55.
11. Substantial regional and hemispheric differences in brain nitric oxide synthase (NOS) inhibition following intracerebroventricular administration of N-nitro-L-arginine (L-NA) and its methyl ester (L-NAME) / M. Salter [et al.] // *Neuropharmacology*. – 1995. – Vol. 34, N 6. – P. 639–649.
12. Levels of free amino acids and their derivatives in the brain cortex of rats during unilateral ischemia / Y. E. Razvodovsky [et al.] // *Int. J. Neurosci. Behav. Studies*. – 2017. – Vol. 1, N 1. – P. 18–21.
13. Кулеш, С. Д. Особенности метаболизма нейроактивных аминокислот в остром периоде ишемического инсульта / С. Д. Кулеш, Е. М. Дорошенко // *Журн. невропатол. и психиатрии*. – 2000. – Т. 100, № 5. – С. 64–65.
14. Современные проблемы биохимии. Методы исследований / Е. В. Барковский [и др.] – Минск : Вышэйш. шк., 2013. – 496 с.
15. Влияние композиции аминокислот с разветвленной углеводородной цепью, триптофана и таурина на обмен аминокислот в экспериментальных моделях алкоголизма / В. Ю. Смирнов [и др.] // *Укр. биохим. журн.* – 2003. – Т. 75, № 4. – С. 101–107.

### References

1. Razvodovskii Yu. E. Alcohol consumption and stroke mortality in Belarus. *Voprosy narkologii* [Questions of narcology], 2009, no. 6, pp. 82–92 (in Russian).
2. Kulesh S. D., Filina N. A., Kostinevich T. M., Kletschkova L. A., Savchenko M. E. Long term outcomes of cerebral stroke in large city of Belarus. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Vestnik of Vitebsk State Medical University], 2011, vol. 10, no. 3, pp. 93–101 (in Russian).

3. Maksimovich Ye. N., Pronko T. P., Maksimovich N. Ye. Epidemiology of ischemic strokes in the Grodno region (Belarus). *24 European Stroke Conference (Vienna, May 13–15, 2015)*. Vienna, 2015, p. 178.
4. Gusev E. I., Skvortsova V. I. *Ischemia of the brain*. Moscow, Meditsina Publ., 2001. 327 p. (in Russian).
5. Maksimovich N. Ye. Tolerance of hypoxic hypoxia in rats with cerebral ischemia treated by NO-synthase modulators. *Hypoxia Medical*, 2004, vol. 12, no. 1–2, pp. 20–23.
6. Kulesh S. D. Biochemical mechanisms and role of neuroactive aminoacids. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 1998, no. 1, pp. 21–24 (in Russian).
7. Zablocka B., Domańska-Janik K. Enhancement of 3[H]D-aspartate release during ischemia like conditions in rat hippocampal slices: source of excitatory amino acids. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 1996, vol. 56, no. 1, pp. 63–70.
8. Maksimovich N. E. *The role of nitrogen oxide in ischemic and reperfusional damages to the brain*. Grodno, Grodno State Medical University Publ., 2004. 180 p. (in Russian).
9. Moncada S., Palmer R., Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 1991, vol. 43, no. 2, pp. 109–142.
10. Pokrovskii M. V., Kochkarov V. I., Pokrovskaya T. G., Artyushkova E. B., Pashin E. N., Danilenko L. M., Korokin M. V., Belous A. S., Malykhin V. A. The study of the endothelium protective effects of drugs of different groups on the model of L-NAME induced nitric oxide deficiency. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of Volgograd State Medical University*, 2010, no. 3, pp. 52–55.
11. Salter M., Duffy C., Garthwaite J., Strijbos P. J. Substantial regional and hemispheric differences in brain nitric oxide synthase (NOS) inhibition following intracerebroventricular administration of N-nitro-L-arginine (L-NA) and its methyl ester (L-NAME). *Neuropharmacology*, 1995, vol. 34, no. 6, pp. 639–649.
12. Razvodovsky Y. E., Troyan E. I., Doroshenko E. M., Smirnov V. Yu., Maksimovich N. Ye. Levels of free amino acids and their derivatives in the brain cortex of rats during unilateral ischemia. *International Journal of Neuroscience and Behavior Studies*, 2017, vol. 1, no. 1, pp. 18–21.
13. Kulesh S. D., Doroshenko E. M. Features of the metabolism of neuroactive amino acids in the acute period of ischemic stroke. *Zhurnal nevropatologii i psikiatrii* [Journal of neuropathology and psychiatry], 2000, vol. 100, no. 5, pp. 64–65 (in Russian).
14. Barkovskii E. V., Bokut' S. B., Borodinskii A. N., Buko V. U., Valentyukevich O. I., Gritsuk, A. I., Danchenko E. O., Doroshenko E. M., Dremza I. K., Drozdov A. S. *Contemporary problems of biochemistry. Methods of investigation*. Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 2013. 496 p. (in Russian).
15. Smirnov V. Yu., Razvodovskii Yu. E., Doroshenko E. M., Ostrovsky S. Yu. The effect of the composition of amino acids with a branched hydrocarbon chain, tryptophan and taurine on the exchange of amino acids in experimental models of alcoholism. *Ukrainskii biokhimičeskii zhurnal* [Ukrainian biochemical journal], 2003, vol. 75, no. 4, pp. 101–107 (in Russian).

### Информация об авторах

*Разводовский Юрий Евгеньевич* – науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: razvodovsky@tut.by

*Смирнов Виталий Юрьевич* – канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vit\_sm@mail.ru

*Максимович Наталья Евгеньевна* – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: mne@grsmu.by

*Семененя Игорь Николаевич* – д-р мед. наук, профессор, директор. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (бульвар Ленинского комсомола, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: insemenenya@yandex.by

### Information about the authors

*Yury E. Razvodovsky* – Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: razvodovsky@tut.by

*Vitaly Yu. Smirnov* – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor, Senior researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vit\_sm@mail.ru

*Natalia Ye. Maksimovich* – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: mne@grsmu.by

*Igor N. Semenenya* – D. Sc. (Med.), Professor, Director. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, BLK, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: insemenenya@yandex.by

Е. В. Руденко<sup>1</sup>, Э. В. Руденко<sup>2</sup>, О. Ю. Самоховец<sup>3</sup>, Е. В. Кобец<sup>4</sup>, П. М. Морозик<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Минский городской центр остеопороза и болезней костно-мышечной системы,  
Минск, Республика Беларусь

<sup>4</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

### АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D С ПОКАЗАТЕЛЯМИ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ У ЖЕНЩИН В МЕНОПАУЗЕ

**Аннотация.** Проанализирована взаимосвязь полиморфных вариантов гена рецептора витамина D (*VDR*) с показателями минеральной плотности костной ткани (МПКТ) у женщин в менопаузе. В исследование были включены 66 пациенток с постменопаузальным остеопорозом (ПМО) и 170 постменопаузальных женщин с нормальными значениями МПКТ (КОН). Выявлены различия между группами в распределении частот генотипов и аллелей для полиморфного варианта *ApaI* гена *VDR*: для лиц с генотипом *C/C* риск остеопороза повышен по сравнению с носителями генотипа *A/A* (OR = 2,7 [95 % CI: 1,5–4,7],  $p = 0,002$ ). Аллель *A* более распространен в группе КОН и снижает риск заболевания (OR = 0,6 [95 % CI: 0,4–0,8],  $p = 0,001$ ). Статистически значимые различия выявлены между исследуемыми группами при анализе распределения частот генотипов полиморфного варианта *BsmI* гена *VDR*. Среди носителей неблагоприятного генотипа *G/G* полиморфного варианта *BsmI* риск ПМО повышен по сравнению с носителями генотипа *A/A* (OR = 2,1 [95 % CI: 1,0–4,4],  $p = 0,02$ ). Среди носителей аллеля *A* риск остеопороза существенно снижен (OR = 0,6 [95 % CI: 0,4–0,9],  $p = 0,007$ ). МПКТ у носителей генотипа *ApaI C/C* на 13,7 % ниже, чем у носителей генотипа *ApaI A/A* (0,767 и 0,872 г/см<sup>2</sup> соответственно,  $p = 0,04$ ), а у носителей генотипа *TaqI C/C* – на 13,8 % ниже, чем у носителей генотипа *TaqI T/T* (0,803 и 0,914 г/см<sup>2</sup> соответственно,  $p = 0,03$ ).

Установлено, что полиморфизм гена *VDR* может играть ключевую роль в предрасположенности к остеопорозу и ассоциирован с уровнем МПКТ у женщин в постменопаузе.

**Ключевые слова:** ген рецептора витамина D, постменопаузальный остеопороз, минеральная плотность костной ткани

**Для цитирования:** Ассоциация полиморфных вариантов гена рецептора витамина D с показателями минеральной плотности костной ткани у женщин в менопаузе / Е. В. Руденко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 192–201. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-192-201>

A. V. Rudenka<sup>1</sup>, E. V. Rudenka<sup>2</sup>, V. Yu. Samokhovec<sup>3</sup>, K. V. Kobets<sup>4</sup>, P. M. Marozik<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Minsk City Center for Osteoporosis and Bone-Muscular Diseases Prevention, Minsk, Republic of Belarus

<sup>4</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

### ASSOCIATION OF VITAMIN D RECEPTOR GENE POLYMORPHISM WITH A BONE MINERAL DENSITY LEVEL IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

**Summary.** The analysis of association of polymorphic variants of the vitamin D receptor gene (*VDR*) with bone mineral density (BMD) values in menopausal women was performed. The study included 66 patients with postmenopausal osteoporosis (PMO group) and 170 postmenopausal women with normal BMD values (CON group). The statistically significant difference between the analyzed groups in the genotypes and the alleles frequency distribution for the *VDR* *ApaI* gene variant was revealed: for the carriers of *C/C* genotype, the risk of osteoporosis was higher compared to individuals with *A/A* genotype (OR = 2.7 [95 % CI: 1.5–4.7],  $p = 0.002$ ). Allele *A* was overrepresented in the CON group and associated with the reduced risk of disease (OR = 0.6 [95 % CI: 0.4–0.8],  $p = 0.001$ ). Statistically significant differences were found between the studied groups when analyzing *VDR* *BsmI* gene variant distribution. For the individuals with the unfavorable *VDR* *BsmI* *G/G*-genotype, the risk of PMO was significantly higher when compared to the carriers of the *A/A*-genotype (OR = 2.1 [95 % CI: 1.0–4.4],  $p = 0.02$ ). For the bearers of *A*-allele, the risk of osteoporosis was significantly lower (OR = 0.6 [95 % CI: 0.4–0.9],  $p = 0.007$ ). Among the carriers of the *VDR* *ApaI* *C/C*-genotype, the average BMD level was by 13.7 % lower compared to the carriers

of the *VDR* ApaI A/A-genotype (0.767 and 0.872 g/cm<sup>2</sup>, respectively,  $p = 0.04$ ); among individuals with the TaqI C/C-genotype, the BMD level was by 13.8 % lower compared to TaqI T/T-genotype bearers (0.803 and 0.914 g/cm<sup>2</sup>, respectively,  $p = 0.03$ ).

*VDR* gene polymorphism may play an important role in the susceptibility to osteoporosis and is significantly associated with the BMD level in postmenopausal women.

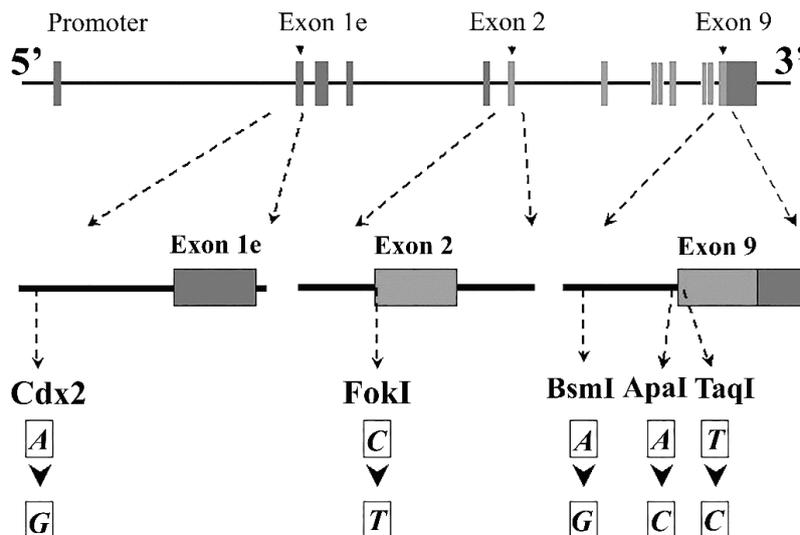
**Keywords:** vitamin D receptor gene, postmenopausal osteoporosis, bone mineral density

**For citation:** Rudenka A. V., Rudenka E. V., Samokhovec V. Yu., Kobets K. V., Marozik P. M. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with a bone mineral density level in postmenopausal women. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 192–201 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-192-201>

**Введение.** Витамин D – секостероидный гормон, который реализует свои многочисленные клеточные эффекты путем инициации транскрипции витамин D-зависимых генов. Исследования последних двух десятилетий показали, что разнообразные биологические действия активного метаболита витамина D – 1,25-дигидроксивитамина D (кальцитриола) – осуществляются посредством модуляции экспрессии генов, которые опосредованы взаимодействием с внутриклеточным рецептором витамина D (vitamin D receptor – VDR). VDR относится к семейству ядерных рецепторов стероидно-тиреоидных гормонов, к которому также относятся рецепторы ретиноевой кислоты, гормонов щитовидной железы, половых гормонов и гормонов надпочечников. Активация *VDR* посредством прямого взаимодействия с 1,25(OH)<sub>2</sub>D вызывает быстрое связывание рецептора с регуляторными областями генов-мишеней, что инициирует транскрипцию и синтез новых молекул м-РНК, трансляцию м-РНК, синтез новых белков и осуществление конкретных биологических реакций. Эти реакции специфичны для различных тканей и варьируются от очень сложных механизмов, необходимых для гомеостатического контроля минерального метаболизма, до фокальных воздействий, которые регулируют рост, дифференцировку, пролиферацию, апоптоз, адаптивный и врожденный иммунный ответ и функциональную активность многих типов клеток. Одной из основных функций витамина D является регуляция кальций-фосфорного обмена в кишечнике и почках. В кишечнике кальцитриол способствует активному клеточному поглощению кальция и его транспорту путем индукции апикальных кальциевых каналов (TRPV5 и TRPV6), цитозольного кальций-связывающего белка-кальбиндина, кальциевой АТФазы, Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обменников [1]. В почечных канальцах кальцитриол контролирует собственный гомеостаз (подавление 1- $\alpha$ -гидроксилазы и стимуляцию 24-гидроксилазы), потенцирует эффекты ПТГ на реабсорбцию кальция и индуцирует трансэпителиальный перенос кальция с помощью TRPV5, кальбиндина и кальциевой АТФазы [2]. Связываясь с VDR, которые присутствуют во всех клетках костной ткани – остеобластах, остеоцитах, остеокластах, кальцитриол оказывает прямое действие на костный метаболизм.

VDR является продуктом соответствующего гена – *VDR*, который определяет его структуру и функциональную активность. Ген *VDR* человека локализуется в 12-й хромосоме (12q12-14) и состоит из 14 экзонов, охватывающих около 75 Кб: 8 белок-кодирующих экзонов (2–9), 6 не-транслируемых экзонов 1A–1F, расположенных на некодирующем участке 5' и несколько промоторных областей – последовательностей нуклеотидов ДНК, распознаваемых РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала специфической транскрипции [3]. Изучены несколько мутаций гена *VDR*, представляющие собой однонуклеотидные замены, которые можно распознать с помощью соответствующих ферментов рестрикции – эндонуклеаз BsmI, ApaI, TaqI, FokI, Cdx2. Большинство полиморфных вариантов в гене *VDR* обнаруживается в регуляторных областях, таких как область промотора и 3'-нетранслируемая область. Модификации в регуляторном участке гена могут изменять последовательность аминокислот синтезируемого белка и приводить к таким функциональным эффектам, как изменение сродства к лиганду. Структура гена *VDR* и его наиболее изученные полиморфные варианты представлены на рисунке.

Полиморфный вариант Cdx2 (замена G/A) расположен в промоторной области 1e гена *VDR*, в сайте связывания Cdx2. Предполагается, что этот сайт играет важную роль в специфической транскрипции гена *VDR* в кишечнике и определяет регулируемую роль витамина D в абсорбции кальция в кишечнике. В некоторых исследованиях было продемонстрировано, что аллель А имеет большую транскрипционную активность, чем G-аллель [4]. Аллель А вызывает повышенную экспрессию *VDR* в кишечнике и может увеличивать транскрипцию кальций-транспортирующих



Структура гена рецептора витамина D  
Structure of the vitamin D receptor gene

белков, таких как кальбиндин, каналобразующих белков суперсемейства TRP, наиболее селективных по кальцию, – TRPV5, TRPV6 [5]. Таким образом, наличие аллеля А способствует повышению абсорбции кальция в кишечнике и может привести к увеличению минеральной плотности костной ткани (МПКТ). Хотя для японских женщин – носительниц аллеля А действительно было характерно увеличение МПКТ, у женщин европеоидной расы подобной ассоциации не выявлено. Тем не менее, как показало обследование женщин европеоидной популяции, аллель А полиморфизма *Cdx2* связан со сниженным риском низкоэнергетических переломов независимо от МПКТ [6]. Несмотря на то что ассоциация этого полиморфного варианта с МПКТ была выявлена в приведенных выше исследованиях, точный механизм, при котором наличие аллеля А обуславливает более низкий риск перелома, еще не выяснен и требует дальнейшего изучения.

Полиморфный вариант *FokI* (rs2228570) находится в кодирующей области гена *VDR* (экзон 2), приводит к альтернативному сайту инициации транскрипции вследствие замены тимина (Т) на цитозин (С) и оказывает влияние на активность рецептора, которая зависит от длины аминокислотной последовательности: протеин, синтезируемый F-аллелем (ACG-вариант), на три аминокислоты короче, чем продукт f-аллеля (ATG-вариант), и обладает в 1,7 раза большей активностью [7]. Более того, это единственный полиморфизм, который не связан ни с одним из других полиморфных вариантов гена *VDR*, что свидетельствует о его уникальной роли в регуляции МПКТ. Распределение разных генотипов *FokI* в европеоидной популяции составляет приблизительно 45 % Ff, 40 % FF и 15 % ff [8]. Показано, что женщины с ff-генотипом имели более низкие значения МПКТ шейки бедра и более высокие уровни маркера костной резорбции N-телопептида, чем носительницы FF-генотипа [9, 10].

Полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов *BsmI*, *ApaI* и *TaqI* расположены в 3'-нетранслируемом участке гена *VDR* и находятся в тесном неравновесном сцеплении. Эти три полиморфизма не изменяют аминокислотную последовательность кодируемого белка, но влияют на экспрессию гена посредством регуляции стабильности мРНК [11]. Одним из наиболее часто изучаемых полиморфизмов является *BsmI* (rs1544410), который находится в тесном неравновесном сцеплении с полиморфизмом *TaqI* (rs731236), а частоты его гаплотипов ассоциируются с повышенным уровнем экспрессии *VDR*. Показано, что полиморфный вариант *BsmI* связан с активностью или экспрессией *VDR*. Многочисленные исследования, изучающие состояние МПКТ у женщин, ассоциировали аллель В с низкими показателями МПКТ [12–16]. Кроме того, результаты мета-анализа 26 исследований выявили снижение риска остеопороза, связанного с генотипом bb (отношение шансов (OR) 0,61, 95 %-ный доверительный интервал (CI) 0,40–0,92) [17].

Результаты приведенных выше исследований свидетельствуют о важной роли витаминов D-эндокринной системы в регуляции метаболизма костной ткани. Определение полиморфизма гена *VDR*, ассоциированного с низкой МПКТ, позволит задолго до начала заболевания выявлять лиц с высоким риском раннего снижения МПКТ и развития остеопороза и проводить в группах риска своевременный комплекс профилактических мероприятий.

Цель данной работы – выявление ассоциации полиморфных вариантов гена рецептора витамина D с показателями минеральной плотности костной ткани у женщин с постменопаузальным остеопорозом (низкой костной массой).

**Материалы и методы исследования.** Исследование проводилось на базе Минского городского центра остеопороза и заболеваний костно-мышечной системы. Критерии включения в исследование: женский пол, продолжительность менопаузы не менее 3 лет. Критерии исключения: наличие сопутствующих заболеваний или прием медикаментов, оказывающих влияние на метаболизм костной ткани (кроме препаратов для лечения остеопороза (препараты кальция, витамин D, бисфосфонаты, деносуида). В группу исследования (группа ПМО) вошли пациентки с постменопаузальным остеопорозом и низкоэнергетическими переломами в анамнезе ( $n = 66$ , средний возраст  $58,3 \pm 6,2$  года), в контрольную группу (группа КОН) – 170 постменопаузальных женщин с нормальными значениями МПКТ, без переломов в анамнезе (средний возраст  $56,7 \pm 7,42$  года). Все включенные в исследование женщины подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Прием пациенток, выявление факторов риска остеопороза и анамнеза низкоэнергетических переломов с помощью специально разработанных анкет, клиническое обследование, измерение МПКТ, забор биологического материала для генетического исследования проводились в Минском городском центре профилактики остеопороза и болезней костно-мышечной системы на базе 1-й городской клинической больницы (г. Минск). Состояние МПКТ исследовали методом двуэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (ДРА) с помощью рентгеновского денситометра LUNAR Prodigy фирмы GE (США) с программным обеспечением CORE v8.5. Измеряли показатели МПКТ поясничных позвонков ( $L_1-L_4$ ) и шеек бедренных костей. Диагноз постменопаузального остеопороза (ПМО) устанавливали на основании показателей T-критерия для женщин европеоидной расы в соответствии с рекомендациями ВОЗ:  $T \geq -1,0$  – норма,  $T = -1,0 \dots -2,5$  – остеопения,  $T \leq -2,5$  – остеопороз. Результаты измерений МПКТ представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка (в г/см<sup>2</sup>).

В качестве биологического материала для генотипирования использовали тотальную геномную ДНК, выделенную из буккального эпителия с помощью коммерческих наборов Нуклеосорб-А (ОДО «Праймтех», Беларусь) согласно инструкции производителя. Анализ полиморфных вариантов *VDR* ApaI (rs7975232), *VDR* BsmI (rs1544410), *VDR* TaqI (rs731236) и *VDR* Cdx2 (rs11568820) осуществляли с помощью коммерческих наборов праймеров и зондов TaqMan® компании AppliedBiosystems (США) в соответствии с инструкцией производителя. Для детекции флуоресценции, а также первичной обработки результатов использовали программное обеспечение CFX Manager 3.1 прибора CFX96, BIO-RAD (США). Во время каждой постановки ПЦР применяли положительный и отрицательный контроли.

Для статистической обработки результатов исследования использовали программу R (<http://www.r-project.org/>) для Windows и дополнительные пакеты для анализа генетических данных SNPAssoc (версия 1.9-2). Наблюдаемые частоты генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона. Для оценки ассоциации между риском костных переломов и исследуемыми вариантами генов применяли коэффициент OR с 95 %-ным CI, показывающий, во сколько раз выше вероятность иметь патологию при наличии определенного генотипа. Для оценки различий между количественными и качественными показателями пациентов исследуемых групп использовали линейную и логистическую регрессии соответственно. Вероятность развития патологии оценивали с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей, генотипов и гаплотипов между пациентами исследуемых групп применяли также логистическую регрессию. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В соответствии с критериями включения и исключения в исследование было включено 66 женщин с постменопаузальным остеопорозом (группа ПМО)

и 170 женщин группы сравнения (группа КОН) (табл. 1). Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что пациенты исследуемых групп не имели отличий по возрасту, весу, росту, индексу массы тела (разница статистически не значима во всех случаях).

Т а б л и ц а 1. Характеристика пациентов с постменопаузальным остеопорозом (ПМО) и лиц контрольной группы (КОН)

Table 1. Characteristics of patients with postmenopausal osteoporosis (MIP) and the control group (KON)

Показатель	ПМО	КОН	<i>p</i>
К-во пациентов	66	170	
Возраст, лет	58,2 (48,4; 69,0)	57,3 (45,7; 69,0)	>0,1
Вес, кг	66,3 (57,0; 74,0)	68,5 (58,0; 76,5)	>0,1
Рост, см	159,8 (155,0;163,0)	162,3 (157,0;166,0)	>0,1
ИМТ, кг/см <sup>2</sup>	25,8 (24,3; 27,9)	26,5 (24,4; 28,7)	>0,1

Примечание. Данные представлены в виде медианы (25 %, 75 % квантили). ИМТ – индекс массы тела.

*Результаты генотипирования.* В дальнейшей работе был проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *VDR* в обеих группах пациентов.

Выбор генетических маркеров осуществляли на основании анализа литературных данных, в которых была показана ассоциация исследуемых полиморфных вариантов генов с уровнем МПКТ у пациентов с остеопорозом. В случае наличия статистически достоверной повышенной частоты того или иного анализируемого варианта гена в группе пациентов по сравнению с таковым в группе сравнения делали вывод об ассоциации этого полиморфного варианта с повышенным риском развития заболевания.

Результаты генотипирования пациентов исследуемых групп по четырем маркерам представлены в табл. 2. Распределение частот генотипов по всем анализируемым полиморфным вариантам гена *VDR* в исследуемых группах не отличалось от ожидаемого распределения Харди–Вайнберга ( $p > 0,05$ ).

Т а б л и ц а 2. Частота аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *VDR* в группе пациентов с постменопаузальным остеопорозом (ПМО) и в группе сравнения (КОН)

Table 2. Frequency of alleles and genotypes of polymorphic variants of the *VDR* gene in the group of patients with postmenopausal osteoporosis (PMO) and the comparison group (KON)

Вариант гена	Генотипы и аллели	Частота, %		$\chi^2$	<i>p</i>	OR (95 % CI)
		ПМО ( <i>n</i> = 66)	КОН ( <i>n</i> = 170)			
<i>VDR</i> ApaI rs7975232	A/A	19,8	30,00	<b>12,8</b>	<b>0,002</b>	0,6 (0,3–1,04)
	A/C	45,1	53,10			0,7 (0,4–1,2)
	C/C	35,2	16,90			<b>2,7 (1,5–4,7)</b>
	A-аллель	42,3	56,60	<b>10,4</b>	<b>0,001</b>	<b>0,6 (0,4–0,8)</b>
	C-аллель	57,7	43,40			<b>1,8 (1,3–2,5)</b>
<i>VDR</i> BsmI rs1544410	A/A	30,9	45,50	<b>7,84</b>	<b>0,02</b>	<b>0,5 (0,3–0,9)</b>
	A/G	53,2	46,40			1,3 (0,8–2,1)
	G/G	16,0	8,20			<b>2,1 (1,0–4,4)</b>
	A-аллель	57,4	68,60	<b>7,26</b>	<b>0,007</b>	<b>0,6 (0,4–0,9)</b>
	G-аллель	42,6	31,40			1,6 (1,1–2,3)
<i>VDR</i> TaqI rs731236	T/T	37,4	49,10	5,47	0,07	0,6 (0,4–1,02)
	T/C	48,4	43,50			1,2 (0,7–1,99)
	C/C	14,3	7,40			2,1 (0,96–4,5)
	T-аллель	61,5	70,80	<b>5,09</b>	<b>0,02</b>	<b>0,7 (0,5–0,95)</b>
	C-аллель	38,5	29,20			<b>1,5 (1,1–2,2)</b>
<i>VDR</i> Cdx2 rs11568820	G/G	78,0	62,8	7,67	0,02	<b>2,1 (1,2–3,8)</b>
	G/A	22,0	33,6			0,6 (0,3–1,0)
	A/A	0,0	3,5			0,2 (0,01–2,7)
	G-аллель	89,0	79,6	7,22	0,07	<b>2,1 (1,2–3,6)</b>
	A-аллель	11,0	20,4			<b>0,5 (0,3–0,8)</b>

При анализе частот распределения аллелей и генотипов в контрольной группе по полиморфному варианту *VDR* ApaI не выявлено отличий от данных, выявленных для европейской популяции [18], по варианту *VDR* BsmI – для британской [19], испанской [20] и словенской [21] популяций, по варианту *VDR* TaqI – для чешской популяции [22], по варианту *VDR* Cdx2 – для словенской популяции [21]. В то же время выявленные в настоящем исследовании различия с другими европейскими популяциями [23] могут быть обусловлены этносом и различиями в критериях включения и исключения.

Полученные результаты генотипирования свидетельствуют о том, что статистически значимые различия между исследуемыми группами в частотах аллелей наблюдаются для всех проанализированных полиморфных вариантов гена *VDR*.

Наиболее существенные различия между исследуемыми группами в распределении частот генотипов и аллелей выявлены для полиморфизма ApaI гена *VDR*. Для лиц, гомозиготных по аллелю С (генотип С/С), риск остеопороза значительно повышен по сравнению с носителями гомозиготного генотипа А/А (OR = 2,7 [95 % CI: 1,5–4,7],  $p = 0,002$ ), что свидетельствует о значительном вкладе аллеля С в предрасположенность к остеопорозу. Кроме того, показано, что среди пациентов с ПМО частота аллеля С выше, чем в группе сравнения (OR = 1,8 [95 % CI: 1,3–2,5],  $p = 0,001$ ). В то же время аллель А более распространен в группе КОН и является протекторным, снижая риск развития заболевания (OR = 0,6 [95 % CI: 0,4–0,8],  $p = 0,001$ ).

Статистически значимые различия между исследуемыми группами также выявлены при анализе распределения частот генотипов полиморфного варианта BsmI гена *VDR*. Среди носителей неблагоприятного генотипа G/G риск постменопаузального остеопороза повышен по сравнению с носителями генотипа А/А (OR = 2,1 [95 % CI: 1,0–4,4],  $p = 0,02$ ). При анализе распределения аллелей по варианту *VDR* BsmI обнаружены также статистически значимые различия между анализируемыми группами ( $p = 0,007$ ) (табл. 2). Среди носителей благоприятного аллеля А риск остеопороза существенно снижен (OR = 0,6 [95 % CI: 0,4–0,9],  $p = 0,007$ ).

Анализ распределения частот генотипов по полиморфизму TaqI гена *VDR* в группах ПМО и КОН не выявил статистически значимой их ассоциации с риском остеопороза. Тем не менее, выявлена незначительная статистически значимая ассоциация аллеля С с увеличением риска заболевания (OR = 1,5, [95 % CI: 1,1–2,2],  $p = 0,02$ ). Примечательно, что у носителей аллеля Т наблюдается обратный эффект (OR = 0,7, [95 % CI: 0,5–0,95],  $p = 0,02$ ).

Согласно представленным в табл. 2 данным, между группами ПМО и КОН наблюдается статистически значимая ассоциация генотипа G/G с риском остеопороза – у носителей этого генотипа риск заболевания существенно повышен (OR = 2,1, [95 % CI: 1,2–3,8],  $p = 0,02$ ). Аналогичный риск на уровне тенденции наблюдается и у носителей аллеля А (OR = 2,1, [95 % CI: 1,2–3,6],  $p = 0,07$ ). В то же время у носителей аллеля А выявлена тенденция протекторного эффекта (OR = 0,5, [95 % CI: 0,3–0,8],  $p = 0,07$ ). В схожих исследованиях [24] было показано, что аллель G обладает протекторным эффектом, способствуя снижению как риска остеопороза, так и риска костных переломов. Отсутствие статистически значимого эффекта в настоящем исследовании может быть обусловлено очень низкой распространенностью аллеля G в европейской популяции [25]. Примечательно, что в группе пациентов с ПМО не выявлено ни одного носителя протекторного гомозиготного генотипа G/G по варианту *VDR* Cdx2 (табл. 2).

На следующем этапе исследования был проведен сравнительный анализ ассоциации уровня МПКТ в поясничных позвонках ( $L_1$ – $L_4$ ) и шейках бедренных костей с результатами генотипирования в объединенной группе пациентов ПМО и КОН. Полученные результаты (табл. 3) свидетельствуют о том, что практически во всех случаях носители гомозиготных генотипов риска имели более низкие показатели МПКТ, чем носители благоприятных генотипов.

Статистически значимая ассоциация показана между уровнем МПКТ шейки бедра и генотипами по вариантам ApaI и TaqI гена *VDR*. Так, среди носителей неблагоприятного генотипа ApaI С/С уровень МПКТ на 13,7 % ниже, чем у носителей генотипа ApaI А/А (0,767 и 0,872 г/см<sup>2</sup> соответственно,  $p = 0,04$ ). Схожая картина выявлена и для носителей неблагоприятного варианта TaqI С/С, среди носителей которого уровень МПКТ на 13,8 % ниже по сравнению с благоприятным гомозиготным вариантом TaqI Т/Т (0,803 и 0,914 г/см<sup>2</sup> соответственно,  $p = 0,03$ ). Приме-

Т а б л и ц а 3. Ассоциация уровня МПКТ в позвонках  $L_1-L_4$  и шейке бедра с полиморфными вариантами гена *VDR*T a b l e 3. Association of the BMD level in the vertebrae  $L_1-L_4$  and the femoral neck with polymorphic variants of the *VDR* gene

Вариант гена	Генотип	МПКТ, г/см <sup>2</sup>	
		Поясничные позвонки $L_1-L_4$	Шейка бедра
<i>VDR</i> ApaI rs7975232	A/A	0,983 (0,913; 1,13)	0,872 (0,746; 0,957)
	A/C	1,009 (0,87; 1,138)	0,849 (0,781; 0,916)
	C/C	0,974 (0,851; 1,096)	0,767 (0,696; 0,894)
	<i>p</i>	0,54	<b>0,04</b>
<i>VDR</i> BsmI rs1544410	A/A	0,993 (0,909; 1,118)	0,847 (0,754; 0,930)
	A/G	0,961 (0,859; 1,151)	0,833 (0,735; 0,915)
	G/G	1,052 (0,940; 1,130)	0,839 (0,752; 0,965)
	<i>p</i>	0,37	0,76
<i>VDR</i> TaqI rs731236	T/T	1,035 (0,925; 1,128)	0,914 (0,825; 0,968)
	T/C	0,973 (0,833; 1,145)	0,849 (0,726; 0,935)
	C/C	1,071 (0,869; 1,132)	0,803 (0,694; 0,847)
	<i>p</i>	0,21	<b>0,03</b>
<i>VDR</i> Cdx2 rs11568820	G/G	0,994 (0,858; 1,105)	0,839 (0,75; 0,921)
	G/A	0,993 (0,875; 1,135)	0,838 (0,742; 0,925)
	A/A	N/A	N/A
	<i>p</i>	0,16	0,44

П р и м е ч а н и е. Значения МПКТ представлены в виде медианы (25 %; 75 %). Значение *p* получено по результатам сравнения гомозиготных генотипов.

чительно, что для носителей гетерозиготных вариантов по обоим маркерам наблюдается промежуточный уровень МПКТ (табл. 3).

В целом, полученные данные сопоставимы с результатами других исследований, проводимых на европейской популяции [23]. Обращает на себя внимание лишь отсутствие статистически значимой ассоциации между уровнем МПКТ и вариантами генотипов по *VDR* BsmI. Тем не менее известно, что этот полиморфный вариант локализован в 3'-некодируемом участке гена и вовлечен в регуляцию стабильности мРНК *VDR*. Таким образом, вариант BsmI не влияет непосредственно на аминокислотную последовательность рецептора витамина D, что, возможно, объясняет отсутствие его ассоциации с уровнем МПКТ. Схожие результаты по отсутствию ассоциации между МПКТ и *VDR* BsmI были получены в двух мета-анализах [26, 27]. Отсутствие статистически значимой ассоциации варианта *VDR* Cdx2 с уровнем МПК обусловлено невысокой распространенностью аллеля А и показано во многих исследованиях [23].

**Заключение.** В ходе проведенного исследования выявлены информативные генетические маркеры, которые статистически значимо ассоциированы с риском развития постменопаузального остеопороза и коррелируют с уровнем минеральной плотности костной ткани. Наибольшей информативностью обладают полиморфные варианты ApaI, BsmI и TaqI гена *VDR*. Полиморфизм гена *VDR* играет ключевую роль в предрасположенности к остеопорозу и ассоциируется с уровнем МПКТ у женщин в постменопаузе, хотя различные варианты этого гена могут по-разному влиять на риск развития этой патологии и во многом определяются этнической принадлежностью. Выявление неблагоприятных вариантов гена *VDR* позволит оценивать индивидуальный риск остеопороза, что существенно повысит качество его профилактики и терапии, снизит вероятность возникновения осложнений.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Vitamin D and intestinal calcium absorption / S. Christakos [et al.] // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2011. – Vol. 347, N 1–2. – P. 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.038>
2. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney / J. G. Hoenderop [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2001. – Vol. 12, N 7. – P. 1342–1349.
3. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter / K.-I. Myamoto [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 1997. – Vol. 11, N 8. – P. 1165–1179. <https://doi.org/10.1210/me.11.8.1165>
4. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine / H. Yamamoto [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 1999. – Vol. 14, N 2. – P. 240–247. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.2.240>
5. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene / H. Arai [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2001. – Vol. 16, N 7. – P. 1256–1264. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.7.1256>
6. *Cdx-2* polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly / Y. Fang [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2003. – Vol. 18, N 9. – P. 1632–1641. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.9.1632>
7. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of *FokI* variants / C. Gross [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 1998. – Vol. 13, N 11. – P. 1691–1699. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.11.1691>
8. Zmuda, J. M. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants / J. M. Zmuda, J. A. Cauley, R. E. Ferrell // *Epidemiol. Rev.* – 2000. – Vol. 22, N 2. – P. 203–217. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018033>
9. Lips, P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications / P. Lips // *Endocr. Rev.* – 2001. – Vol. 22, N 4. – P. 477–501. <https://doi.org/10.1210/er.22.4.477>
10. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. The OFELY study / P. Garnero [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 90, N 8. – P. 4829–4835. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0364>
11. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression / P. W. Jurutka [et al.] // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2001. – Vol. 2, N 2. – P. 203–216.
12. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women / Y. Li [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – Vol. 39, N 5. – P. 5709–5717. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1380-3>
13. Association between vitamin D receptor gene *BsmI* polymorphism and bone mineral density in a population of 146 Iranian women / F. Poursmaeili [et al.] // *Cell J.* – 2013. – Vol. 15, N 1. – P. 75–82.
14. Relation of *BsmI* vitamin D receptor gene polymorphism to bone mineral density and occurrence of osteoporosis in postmenopausal Chinese women in Taiwan / H.-Y. Chen [et al.] // *Osteoporosis Int.* – 2001. – Vol. 12, N 12. – P. 1036–1041. <https://doi.org/10.1007/s001980170014>
15. Майлян, Э. А. Влияние полиморфизма 283 A>G (BSMI) гена рецептора витамина D на развитие остеопороза у женщин в постменопаузе / Э. А. Майлян // *Мед. вестн. Юга России.* – 2016. – № 4. – С. 32–38.
16. Association between polymorphisms of *VDR*, *COL1A1*, and *LCT* genes and bone mineral density in Belarusian women with severe postmenopausal osteoporosis / P. Marozik [et al.] // *Medicina (Kaunas).* – 2013. – Vol. 49, N 4. – P. 177–184.
17. Vitamin D receptor *BsmI* polymorphism and osteoporosis risk: a meta-analysis from 26 studies / Fu Jia [et al.] // *Gen. Test. Mol. Biomarkers.* – 2012. – Vol. 17, N 1. – P. 30–34. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0267>
18. Reference SNP (rs) Report: rs7975232 // National Center for Biotechnology Information [Electronic resource]. – Mode of access : [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=7975232](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=7975232). – Date of access : 07.04.2019.
19. Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population / L. A. Houston [et al.] // *Bone.* – 1996. – Vol. 18, N 3. – P. 249–252. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00483-1](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00483-1)
20. Polymorphism of the gene for vitamin D receptor, bone mass, and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis / R. Fontova Garrofé [et al.] // *Rev. Clin. Esp.* – 2000. – Vol. 200, N 4. – P. 198–202. [https://doi.org/10.1016/S0014-2565\(00\)70605-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2565(00)70605-9)
21. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density / S. Mencej-Bedrač [et al.] // *J. Mol. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 42, N 3. – P. 239–247. <https://doi.org/10.1677/jme-08-0108>
22. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and bone turnover: *FokI* genotype is related to postmenopausal bone mass / K. Zajicková [et al.] // *Physiol. Res.* – 2002. – Vol. 51, N 5. – P. 501–509.
23. Associations between *VDR* gene polymorphisms and osteoporosis risk and bone mineral density in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis / L. Zhang [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 981. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18670-7>
24. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene / H. Arai [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2001. – Vol. 16, N 7. – P. 1256–1264. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.7.1256>
25. Reference SNP (rs) Report: rs11568820 // National Center for Biotechnology Information [Electronic resource]. – Mode of access : [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11568820](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11568820). – Date of access : 07.04.2019.
26. Shen, H. Vitamin D receptor gene and risk of fracture in postmenopausal women: a meta-analysis / H. Shen, J. Xie, H. Lu // *Climacteric.* – 2014. – Vol. 17, N 4. – P. 319–324. <https://doi.org/10.3109/13697137.2013.856401>
27. Vitamin D receptor gene *BsmI* and *TaqI* polymorphisms and fracture risk: a meta-analysis / Y. Fang [et al.] // *Bone.* – 2006. – Vol. 39, N 4. – P. 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.04.016>

## References

1. Christakos S., Dhawan P., Porta A., Mady L. J., Seth T. Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2011, vol. 347, no. 1–2, pp. 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.038>
2. Hoenderop J. G., Müller D., van der Kemp A. W., Hartog A., Suzuki M., Ishibashi K., Imai M., Sweep F., Willems P. H., van Os C. H., Bindels R. J. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2001, vol. 12, pp. 1342–1349.
3. Myamoto K.-i., Kesterson R. A., Yamamoto H., Taketani Y., Nishiwaki E., Tatsumi S., Inoue Y., Morita K., Takeda E., Pike J. W. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular Endocrinology*, 1997, vol. 11, no. 8, pp. 1165–1179. <https://doi.org/10.1210/me.11.8.1165>
4. Yamamoto H., Miyamoto K., Li B., Taketani Y., Kitano M., Inoue Y. [et al.]. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1999, vol. 14, no. 2, pp. 240–247. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.2.240>
5. Arai H., Miyamoto K.-I., Yoshida M., Yamamoto H., Taketani Y., Morita K. [et al.]. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, vol. 16, no. 7, pp. 1256–1264. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.7.1256>
6. Fang Y., van Meurs Joyce B. J., Bergink A. P., Hofman A., van Duijn C. M., van Leeuwen J. P., Pols H. A., Uitterlinden A. G. Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2003, vol. 18, no. 9, pp. 1632–1641. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.9.1632>
7. Gross C., Krishnan A. V., Malloy P. J., Eccleshall T. R., Zhao X.-Y., Feldman D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1998, vol. 13, no. 11, pp. 1691–1699. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.11.1691>
8. Zmuda J. M., Cauley J. A., Ferrell R. E. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiologic Reviews*, 2000, vol. 22, no. 2, pp. 203–217. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018033>
9. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocrine Reviews*, 2001, vol. 22, no. 4, pp. 477–501. <https://doi.org/10.1210/er.22.4.477>
10. Garnero P., Munoz F., Borel O., Sornay-Rendu E., Delmas P. D. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. The OFELY study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2005, vol. 90, no. 8, pp. 4829–4835. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0364>
11. Jurutka P. W., Whitfield G. K., Hsieh J. C., Thompson P. D., Haussler C. A., Haussler M. R. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2001, vol. 2, no. 2, pp. 203–216.
12. Li Y., Xi B., Li K., Wang C. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women. *Molecular Biology Reports*, 2012, vol. 39, no. 5, pp. 5709–5717. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1380-3>
13. Poursmaeili F., Jamshidi J., Azargashb E., Samangouee S. Association between vitamin D receptor gene BsmI polymorphism and bone mineral density in a population of 146 Iranian women. *Cell Journal*, 2013, vol. 15, no. 1, pp. 75–82.
14. Chen H.-Y., Chen W.-C., Chen W.-C., Tsai F.-J., Li C.-W., Tsai C.-H. Relation of BsmI vitamin D receptor gene polymorphism to bone mineral density and occurrence of osteoporosis in postmenopausal Chinese women in Taiwan. *Osteoporosis International*, 2001, vol. 12, no. 12, pp. 1036–1041. <https://doi.org/10.1007/s001980170014>
15. Mailyan E. A. The effect of polymorphism 283 A>G (BSMI) of the vitamin D receptor gene on the development of osteoporosis in postmenopausal women. *Meditsinskii vestnik Yuga Rossii* [Medical Herald of the South of Russia], 2016, no. 4, pp. 32–38 (in Russian).
16. Marozik P., Mosse I., Alekna V., Rudenko E., Tamulaitienė M., Ramanau H. [et al.]. Association between polymorphisms of VDR, COL1A1, and LCT genes and bone mineral density in Belarusian women with severe postmenopausal osteoporosis. *Medicina* (Kaunas), 2013, vol. 49, no. 4, pp. 177–184.
17. Fu Jia, Rui-Fen Sun, Qun-Hui Li, Da-Xing Wang, Feng Zhao, Jun-Min Li [et al.]. Vitamin D receptor BsmI polymorphism and osteoporosis risk: a meta-analysis from 26 studies. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2012, vol. 17, no. 1, pp. 30–34. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0267>
18. Reference SNP (rs) Report: rs7975232. *National Center for Biotechnology Information*. Available at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=7975232](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=7975232) (accessed 07.04.2019).
19. Houston L. A., Grant S. F., Reid D. M., Ralston S. H. Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population. *Bone*, 1996, vol. 18, no. 3, pp. 249–252. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00483-1](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00483-1)
20. Fontova Garrofé R., Gutiérrez Fornés C., Broch Montané M., Aguilar Crespillo C., Pujol del Pozo A., Vendrell Ortega J. [et al.]. Polymorphism of the gene for vitamin D receptor, bone mass, and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Revista Clínica Española*, 2000, vol. 200, no. 4, pp. 198–202. [https://doi.org/10.1016/S0014-2565\(00\)70605-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2565(00)70605-9)
21. Mencej-Bedrač S., Preželj J., Kocjan T., Teskač K., Ostanek B., Šmelcer M., Marc J. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2009, vol. 42, no. 3, pp. 239–247. <https://doi.org/10.1677/jme-08-0108>
22. Zajicková K., Zofková I., Bahbouh R., Krepelová A. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and bone turnover: FokI genotype is related to postmenopausal bone mass. *Physiological Research*, 2002, vol. 51, no. 5, pp. 501–509.

23. Zhang L., Yin X., Wang J., Xu D., Wang Y., Yang J. [et al.]. Associations between *VDR* gene polymorphisms and osteoporosis risk and bone mineral density in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 981. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18670-7>

24. Arai H., Miyamoto K., Yoshida M., Yamamoto H., Taketani Y., Morita K. [et al.]. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein *Cdx-2* binding element in the human vitamin D receptor gene. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, vol. 16, no. 7, pp. 1256–1264. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.7.1256>

25. Reference SNP (rs) Report: rs11568820. *National Center for Biotechnology Information*. Available at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11568820](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11568820) (accessed 07.04.2019).

26. Shen H., Xie J., Lu H. Vitamin D receptor gene and risk of fracture in postmenopausal women: a meta-analysis. *Climacteric*, 2014, vol. 17, no. 4, pp. 319–324. <https://doi.org/10.3109/13697137.2013.856401>

27. Fang Y., Rivadeneira F., van Meurs J. B. J., Pols H. A. P., Ioannidis J. P. A., Uitterlinden A. G. Vitamin D receptor gene *BsmI* and *TaqI* polymorphisms and fracture risk: a meta-analysis. *Bone*, 2006, vol. 39, no. 4, pp. 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.04.016>

### Информация об авторах

*Руденко Елена Викторовна* – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [alenska.v.ru@gmail.com](mailto:alenska.v.ru@gmail.com)

*Руденко Эмма Владимировна* – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [rudenka.ema@gmail.com](mailto:rudenka.ema@gmail.com)

*Самоховец Ольга Юрьевна* – канд. мед. наук, врач. Минский городской центр остеопороза и болезней костно-мышечной системы. Минск, Республика Беларусь. E-mail: [samokhovec.olga@gmail.com](mailto:samokhovec.olga@gmail.com)

*Кобец Екатерина Вячеславовна* – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

*Морозик Павел Михайлович* – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [P.Marozik@igc.by](mailto:P.Marozik@igc.by)

### Information about the authors

*Alena V. Rudenka* – Ph. D. (Med.), Assistant professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [alenska.v.ru@gmail.com](mailto:alenska.v.ru@gmail.com)

*Ema V. Rudenka* – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [rudenka.ema@gmail.com](mailto:rudenka.ema@gmail.com)

*Volha Yu. Samokhovec* – Ph. D. (Med.), Doctor. Minsk City Center for Osteoporosis and Bone-Muscular Diseases Prevention. E-mail: [samokhovec.olga@gmail.com](mailto:samokhovec.olga@gmail.com)

*Katsiaryna V. Kobets* – Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

*Pavel M. Marozik* – Ph. D. (Med.), Assistant professor, Leading researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [P.Marozik@igc.by](mailto:P.Marozik@igc.by)

ISSN 1814-6023 (Print)  
ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.155.392.2-036.11-036.87-085:614.8.026.1  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-202-215>

Поступила в редакцию 04.12.2018  
Received 04.12.2018

**Е. А. Столярова<sup>1</sup>, Н. В. Мигаль<sup>1</sup>, М. В. Белевцев<sup>1</sup>, Л. В. Мовчан<sup>1</sup>, О. И. Быданов<sup>1</sup>,  
А. М. Попов<sup>2</sup>, Л. Г. Фечина<sup>3</sup>, О. В. Алейникова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,  
д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии  
им. Дмитрия Рогачева, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup>Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург, Российская Федерация

### **ВЛИЯНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ НА РИСК РАЗВИТИЯ РЕЦИДИВА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

**Аннотация.** Минимальная остаточная болезнь (МОБ) – наиболее значимый прогностический фактор риска развития рецидива у пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Оценка МОБ необходима не только для прогноза рецидива заболевания, но и для дополнительной стратификации пациентов на группы риска с целью индивидуализации терапии и оценки ее качества. В данном исследовании проведен анализ показателей МОБ у пациентов с ОЛЛ на 15-й и 36-й день индукционной терапии, а также оценено их влияние на показатели выживаемости и риск развития рецидива у пациентов с ОЛЛ, получающих лечение согласно протоколу ОЛЛ-МБ 2008.

**Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, клиренс лейкоэмических клеток, бессобытийная выживаемость, кумулятивная частота рецидива

**Для цитирования:** Влияние показателей минимальной остаточной болезни на риск развития рецидива у пациентов с острым лимфобластным лейкозом / Е. А. Столярова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 202–215. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-202-215>

**E. A. Stolyarova<sup>1</sup>, N. V. Migal<sup>1</sup>, M. V. Belevtsev<sup>1</sup>, L. V. Movchan<sup>1</sup>, O. I. Budanov<sup>1</sup>, A. M. Popov<sup>2</sup>,  
L. G. Fechina<sup>3</sup>, O. V. Aleinikova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,  
v. Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus

<sup>2</sup>National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev,  
Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup>Regional Children's Clinical Hospital no. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

### **INFLUENCE OF VALUE OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE AT RISK OF DEVELOPING RECURRENCE OF RELAPSE IN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

**Abstract.** Minimal residual disease (MRD) is the most significant predictor of the relapse in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). MRD evaluation is necessary not only for the prediction of the relapse, but for additional stratification of patients by the risk groups in order to address the issue of the therapy individualization and to evaluate the therapy quality. This study analyzes the MRD parameters in patients with ALL at the stage of induction therapy and evaluates the effect of the value of the minimum residual disease on survival rates and the risk of relapse in patients with ALL treated according to protocol ALL-MB 2008.

**Keywords:** acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, clearance of leukemic cells, event-free survival (EFS), cumulative incidence of relapse (CIR)

**For citation:** Stolyarova E. A., Migal N. V., Belevtsev M. V., Movchan L. V., Budanov O. I., Popov A. M., Fechina L. G., Aleinikova O. V. Influence of value of minimal residual disease at risk of developing recurrence of relapse in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 202–215 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-202-215>

**Введение.** Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) занимает ведущее место в онкогематологической патологии в детском и подростковом возрасте [1, 2]. На долю ОЛЛ приходится до 20 % от всех злокачественных заболеваний и до 75 % от всех лейкозов у детей и подростков [3]. За период с 1960-х по 2000-е годы наблюдалось значительное повышение показателей общей выживаемости детей с ОЛЛ (от 10 до 90 %) [4]. Несмотря на значительные успехи в лечении, рецидив заболевания является основной причиной неудач и возникает примерно у 15–20 % пациентов с ОЛЛ [5, 6]. Лечение рецидива ОЛЛ требует комплексных и инновационных подходов. Дополнительные факторы прогноза рецидива заболевания позволят применять оптимизированную терапию с включением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в зависимости от риска рецидива ОЛЛ [7].

Благодаря изучению молекулярно-биологических и иммунологических особенностей заболевания многие инициальные клиничко-гематологические факторы риска рецидива, такие как возраст, уровень лейкоцитов, наличие органомегалии, опухолевой массы в средостении, были дополнены более надежными предикторами исхода заболевания, такими как иммунофенотип, наличие или отсутствие генетических аномалий лейкоэмических клеток, ответ на терапию [8, 9].

Традиционно для контроля ответа на лечение проводят морфологическое исследование периферической крови и/или аспирата костного мозга [10]. В течение десятилетий оценка морфологического ответа у детей с ОЛЛ на разных этапах терапии являлась критерием стратификации на группы риска рецидива заболевания [11]. Многочисленные исследования продемонстрировали прогностическую значимость быстрого морфологического ответа на начальных этапах полихимиотерапии [12, 13].

Поскольку морфологические методы оценки ответа на терапию у пациентов с ОЛЛ имеют ограниченные чувствительность и специфичность, за последние десятилетия были предприняты усилия для разработки более специфичных и чувствительных методов детекции остаточного пула лейкоэмических клеток, которые могли бы более достоверно выявлять детерминанты ответа на лечение [14, 15].

Такими методами стали определение показателей минимальной остаточной болезни (МОБ) с помощью проточной цитометрии и ПЦР в реальном времени для детекции реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора. Оба метода имеют как преимущества, так и недостатки. Так, основными достоинствами определения МОБ по реаранжировкам генов иммуноглобулинов и TCR являются высокая чувствительность ( $10^4$ – $10^5$ ) и высокая степень стандартизации. Использование ДНК в качестве аналитического материала дает возможность длительного хранения образцов для последующего ретроспективного анализа [16]. Однако метод ПЦР в реальном времени для определения показателей МОБ довольно трудоемкий и дорогостоящий, а кроме того, требует значительных затрат времени для выполнения. Метод определения МОБ с помощью проточной цитометрии менее трудоемкий и требует меньших затрат времени для выполнения, чем метод определения показателей МОБ по реаранжировкам генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора, что особенно важно на этапе индукционного лечения. Этот фактор является ключевым в тех случаях, когда осуществляется оптимизация терапии в зависимости от уровня МОБ [17, 18]. Чувствительность метода проточной цитометрии варьируется в зависимости от количества цветов, применяемых в проточном цитофлуориметре для определения МОБ: при использовании 3-цветовой проточной цитофлуориметрии чувствительность метода составляет  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  клеток, в случае применения 6–8-цветовой проточной цитофлуориметрии она составляет  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  клеток и сопоставима с чувствительностью метода ПРЦ в реальном времени [19–21].

Оценка показателей МОБ на разных этапах полихимиотерапии обладает определенной прогностической значимостью. Ранний ответ на терапию, детектируемый показателями МОБ в конце индукции, в настоящее время является самым важным прогностическим фактором у пациентов с ОЛЛ [22]. H. Cavé с соавт. [23], а также J. van Dongen с соавт. [24] продемонстрировали высокую прогностическую значимость показателей МОБ после окончания консолидирующей терапии. Положительное значение МОБ после поддерживающей терапии может указывать на развитие рецидива заболевания [17]. Прогностическая значимость показателей МОБ, определяемых перед аллогенной ТГСК, продемонстрирована многими исследованиями, где значение

МОБ явилось предиктором исхода алло-ТГСК у пациентов с ОЛЛ [25, 26]. В основных крупных клинических исследованиях терапии ОЛЛ у детей рекомендуется мониторинг показателей МОБ в нескольких временных точках наблюдения для оценки элиминации лейкемических клеток и определения прогностического значения показателей МОБ на разных этапах терапии [11, 13, 27, 28].

Цель исследования – оценить прогностическое значение показателей минимальной остаточной болезни на 15-й день терапии и статус иммунофенотипической ремиссии на этапе окончания индукционной терапии на отдаленные результаты лечения пациентов с острым лимфобластным лейкозом согласно протоколу ОЛЛ-МБ 2008.

**Объекты и методы исследования.** В Республике Беларусь с февраля 2008 г. по ноябрь 2014 г. для лечения детей и подростков с ОЛЛ применялся протокол терапии ОЛЛ-МБ 2008. Данный протокол, представляющий собой результат работы кооперативной группы Москва–Берлин по исследованию острого лимфобластного лейкоза у детей и подростков, применялся в 68 клиниках России, Республики Беларусь, Узбекистана и Армении [29]. Исследование предусматривало распределение пациентов на три группы: стандартного (SRG), промежуточного (ImRG) и высокого (HRG) риска. При распределении по группам риска использовали следующие критерии: инициальный лейкоцитоз, инициальные размеры селезенки, инициальное поражение центральной нервной системы, иммунофенотипический вариант ОЛЛ, наличие транслокаций  $t(4; 11)$  и  $t(9; 22)$  и достижение ремиссии на 36-е сутки терапии (рис. 1).

Определение МОБ у пациентов с ОЛЛ, получающих лечение по протоколу ОЛЛ-МБ 2008, носило исследовательский характер и выполнялось только в трех клинических гематологических центрах – Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь), учреждении здравоохранения Свердловской области РФ «Областная детская клиническая больница № 1» (Екатеринбург, Российская Федерация), Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (Москва, Российская Федерация). Клиническое исследование ALL-MB 2008 было успешно завершено в 2014 г.

В исследование было включено 517 пациентов с ОЛЛ из предшественников В-лимфоцитов (возраст от 1 до 18 лет, медиана возраста 4,16 года), не имеющих транслокаций  $t(9; 22)$ ,  $t(4; 11)$  с известным значением МОБ на 15-й и 36-й день терапии.

Из всех обследуемых пациентов, получавших лечение в указанных выше учреждениях здравоохранения, 266 (51,45 %) детей были отнесены к SRG типу, 215 (41,59 %) – к ImRG, 36 (6,96 %) – к HRG.



Рис. 1. Критерии стратификации пациентов на группы риска согласно протоколу ОЛЛ-МБ 2008

Fig. 1. Criteria for stratification of patients into risk groups according to the ALL-MB 2008 protocol

Забор костного мозга для определения показателей МОБ выполняли на 15-й и 36-й день индукционной терапии. Значение МОБ определяли с помощью метода 4–6-цветовой проточной цитометрии. Статус иммунофенотипической ремиссии оценивали по количеству бластных клеток в костном мозге. Если показатель МОБ составлял менее 0,01 % на 36-й день терапии, это расценивали как отрицательное значение МОБ (иммунофенотипическая ремиссия), а если доля бластных клеток в костном мозге составляла 0,01 % и более – как положительное значение МОБ (отсутствие иммунофенотипической ремиссии).

На 15-й день индукционной терапии среди обследуемых пациентов у 122 (23,6 %) отмечалось отрицательное значение МОБ (МОБ < 0,01 %) в связи с отсутствием субстрата лейкемических клеток, детектируемых методом 4–6-цветовой проточной цитометрии, оценку клиренса во временной период с 15-го по 36-й день индукционной терапии у данных пациентов не проводили.

В зависимости от значения МОБ на 15-й день терапии и статуса иммунофенотипической ремиссии к окончанию индукционной терапии все пациенты были разделены на три основные группы.

Группа 1 – пациенты со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день индукционной терапии ( $n = 101$ ). Среди детей с ОЛЛ со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день терапии 74 (73,27 %) пациента имели снижение данного показателя к 36-му дню до значения  $< 0,01$  %, у 27 (26,73 %) пациентов иммунофенотипическая ремиссия к окончанию индукционной терапии отсутствовала.

Группа 2 – пациенты со значением МОБ от  $\geq 0,1$  до  $< 1$  % на 15-й день индукционной терапии ( $n = 133$ ). Снижение данного показателя до отрицательного значения к 36-му дню индукционной терапии наблюдалось у 81 (60,90 %) пациента, у 52 (39,10 %) детей констатировано отсутствие иммунофенотипической ремиссии к окончанию индукционной терапии.

Группа 3 – пациенты со значением МОБ  $> 1$  % на 15-й день терапии ( $n = 161$ ). Снижение данного показателя к 36-му дню до отрицательного значения (МОБ < 0,01 %) зарегистрировано у 43 (26,71 %) детей, у 118 (73,29 %) пациентов наблюдалось отсутствие иммунофенотипической ремиссии к окончанию индукционной терапии (табл. 1).

Таблица 1. Распределение пациентов с ОЛЛ в зависимости от значения МОБ на 15-й день терапии и статуса иммунофенотипической ремиссии к 36-му дню индукционной терапии согласно протоколу ОЛЛ-МБ 2008

Table 1. Distribution of ALL patients depending on the MRD value on the 15th day of therapy and the status of immunophenotypic remission on the 36th day of induction therapy according to the ALL-MB 2008 protocol

15-й день индукционной терапии ( $n = 517$ )		36-й день индукционной терапии		
Значение МОБ, %	$n$	Значение МОБ, %	$n$	%
<0,01	122	<0,01	119	97,54
		$\geq 0,01$	3	2,46
$\geq 0,01$ – $< 0,1$	101	<0,01	74	73,27
		$\geq 0,01$	27	26,73
$\geq 0,1$ – $< 1$	133	<0,01	81	60,90
		$\geq 0,01$	52	39,10
$> 1$	161	<0,01	43	26,71
		$\geq 0,01$	118	73,29

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения R-Statistics версии 3.4.2. При сравнении по качественным признакам использовали критерий  $\chi^2$ . Для оценки выживаемости пациентов применяли метод Каплана–Майера. При расчете бессобытийной выживаемости (БСВ) под событиями понимали рецидив, смерть вследствие любой причины как первое событие. Уровень различий в выживаемости пациентов в группах оценивали с помощью log-rang теста. Кумулятивную частоту развития рецидивов (КЧР) рассчитывали методом конкурирующих рисков, различия в кумулятивных частотах – с помощью теста Gray.

Цензурирование наблюдений проведено 01.01.2018. Медиана периода наблюдения составила 5,57 года.

Результаты исследования. В группе пациентов со значением МОБ  $<0,01$  % ( $n = 122$ ) на 15-й день индукционной терапии в полной продолжительной ремиссии (ППР) находились 117 (95,90 %) детей, у 2 (1,64 %) пациентов развился рецидив заболевания. БСВ пациентов исследуемой группы составила  $97 \pm 2$  %, КЧР –  $2,0 \pm 1,4$  %.

Среди пациентов со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $<0,1$  % на 15-й день индукционной терапии ( $n = 101$ ) в ППР находились 94 (93,10 %) ребенка, зарегистрировано 5 (4,95 %) пациентов с рецидивом ОЛЛ. БСВ пациентов исследуемой группы составила  $93 \pm 3$  %, КЧР –  $6,1 \pm 2,7$  %.

В группе пациентов со значением МОБ от  $\geq 0,1$  до  $<1$  % на 15-й день индукционной терапии ( $n = 133$ ) констатировано 9 (6,77 %) рецидивов ОЛЛ. В ППР находились 128 (90,98 %) пациентов, при этом показатель БСВ в данной группе составил  $91 \pm 3$  %, КЧР –  $8,0 \pm 2,8$  %.

Среди пациентов со значением МОБ от  $\geq 1$  до  $<10$  % на 15-й день индукционной терапии ( $n = 105$ ) в ППР находились 80 (76,19 %) детей с ОЛЛ, зарегистрировано 19 (18,09 %) пациентов с рецидивом заболевания. БСВ пациентов исследуемой группы составила  $75 \pm 5$  %, КЧР –  $21,5 \pm 5,0$  %.

Наиболее низкий показатель БСВ ( $71 \pm 6$  %) и высокий показатель КЧР ( $24,0 \pm 5,9$  %) отмечались в группе пациентов с МОБ  $\geq 10$  % на 15-й день индукционной терапии. В данную группу было включено 56 пациентов с ОЛЛ, из них 40 (71,43 %) детей находились в ППР, у 13 (23,21 %) пациентов наблюдался рецидив ОЛЛ (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Результаты лечения пациентов с ОЛЛ ( $n = 517$ ) по протоколу ОЛЛ-МБ 2008 в зависимости от значения МОБ на 15-й день индукционной терапии

Table 2. Results of treatment of ALL patients ( $n = 517$ ) according to the ALL-MB 2008 protocol depending on the MRD value on the 15th day of induction therapy

Значение МОБ на 15-й день терапии, %	К-во пациентов	ППР	Рецидивы	Номер линии	БСВ, %	$p_{\log\text{-rank}}$	Номер линии	КЧР, %	$p_{\text{Gray}}$
$<0,01$	122	117	2	1	$97 \pm 2$	$<0,0001$	6	$2,0 \pm 1,4$	$<0,0001$
$\geq 0,01 - <0,1$	101	94	5	2	$93 \pm 3$		7	$6,1 \pm 2,7$	
$\geq 0,1 - <1$	133	121	9	3	$91 \pm 3$		8	$8,0 \pm 2,8$	
$\geq 1 - <10$	105	80	19	4	$75 \pm 5$		9	$21,5 \pm 5,0$	
$\geq 10$	56	40	13	5	$71 \pm 6$		10	$24,0 \pm 5,9$	

На рис. 2 представлены показатели БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ, получавших лечение по протоколу ОЛЛ-МБ 2008 в зависимости от значения МОБ на 15-й день индукционной терапии.

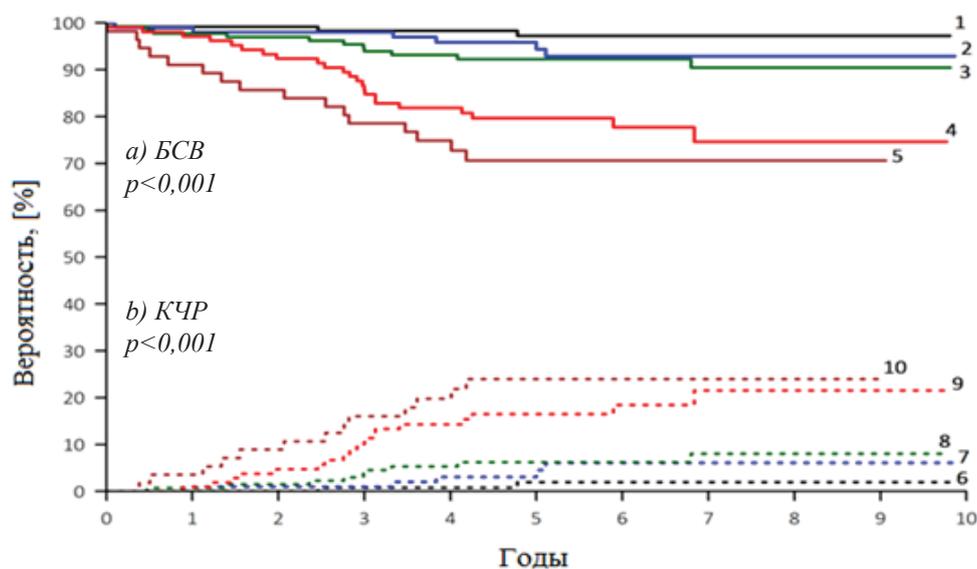


Рис. 2. БСВ (а) и КЧР (б) пациентов с ОЛЛ, получающих лечение по протоколу ОЛЛ-МБ 2008, в зависимости от значения МОБ на 15-й день индукционной терапии (номера линий приведены в табл. 2)

Fig. 2. Preexisting survival (a) and cumulative recurrence rate (b) of ALL patients receiving treatment according to the ALL-MB 2008 protocol depending on the MRD value on the 15th day of induction therapy

В группе пациентов со значением МОБ <0,01 % на 36-й день индукционной терапии ( $n = 317$ ) в ППР находились 295 (93,10 %) детей, выявлено 12 (3,78 %) пациентов с рецидивом ОЛЛ. БСВ пациентов исследуемой группы составила  $94 \pm 2$  %, КЧР –  $4,6 \pm 1,3$  %. Среди пациентов ( $n = 134$ ) со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до <0,1 % на 36-й день индукционной терапии 116 (86,57 %) находились в ППР, зарегистрировано 14 (10,45 %) детей с рецидивом ОЛЛ. БСВ пациентов исследуемой группы составила  $85 \pm 4$  %, КЧР –  $12,8 \pm 3,4$  %.

В группе пациентов ( $n = 48$ ) со значением МОБ от  $\geq 0,1$  до <1 % на 36-й день индукционной терапии выявлено 16 (33,33 %) детей с рецидивом ОЛЛ, в ППР находился 31 (64,58 %) пациент. БСВ пациентов данной группы составила  $64 \pm 7$  %, КЧР –  $34,1 \pm 7,1$  %.

Среди пациентов со значением МОБ от  $\geq 1$  до <10 % на 36-й день индукционной терапии ( $n = 13$ ) в ППР находились 8 (61,54 %) детей с ОЛЛ, у 5 (38,46 %) детей зарегистрирован рецидив заболевания. БСВ пациентов исследуемой группы составила  $52 \pm 18$  %, КЧР –  $48,1 \pm 20,0$  %.

Наиболее низкий показатель БСВ ( $40 \pm 22$  %) и высокий показатель КЧР ( $20,0 \pm 20,0$  %) констатированы у пациентов с МОБ  $\geq 10$  % на 36-й день индукционной терапии. В данную группу вошли 5 пациентов с ОЛЛ, из них 2 (40,0 %) детей находились в ППР, у 1 (20,0 %) пациента зарегистрирован рецидив ОЛЛ (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Результаты лечения пациентов с ОЛЛ ( $n = 517$ ) по протоколу ОЛЛ-МБ 2008 в зависимости от значения МОБ на 36-й день индукционной терапии

Table 3. Results of treatment of ALL patients ( $n = 517$ ) according to the ALL-MB 2008 protocol depending on the MRD value on the 36th day of induction therapy

Значение МОБ на 36-й день терапии, %	К-во пациентов	ППР	Рецидивы	Номер линии	БСВ, %	$p_{\log\text{-rank}}$	Номер линии	КЧР, %	$p_{\text{Gray}}$
<0,01	317	295	12	1	$94 \pm 2$	<0,0001	6	$4,6 \pm 1,3$	<0,0001
$\geq 0,01$ –<0,1	134	116	14	2	$85 \pm 4$		7	$12,8 \pm 3,4$	
$\geq 0,1$ –<1	48	31	16	3	$64 \pm 7$		8	$34,1 \pm 7,1$	
$\geq 1$ –<10	13	8	5	4	$52 \pm 18$		9	$48,1 \pm 20,0$	
$\geq 10$	5	2	1	5	$40 \pm 22$		10	$20,0 \pm 20,0$	

На рис. 3 представлены показатели БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ, получающих лечение по протоколу ОЛЛ-МБ 2008 в зависимости от значения МОБ на 36-й день терапии.

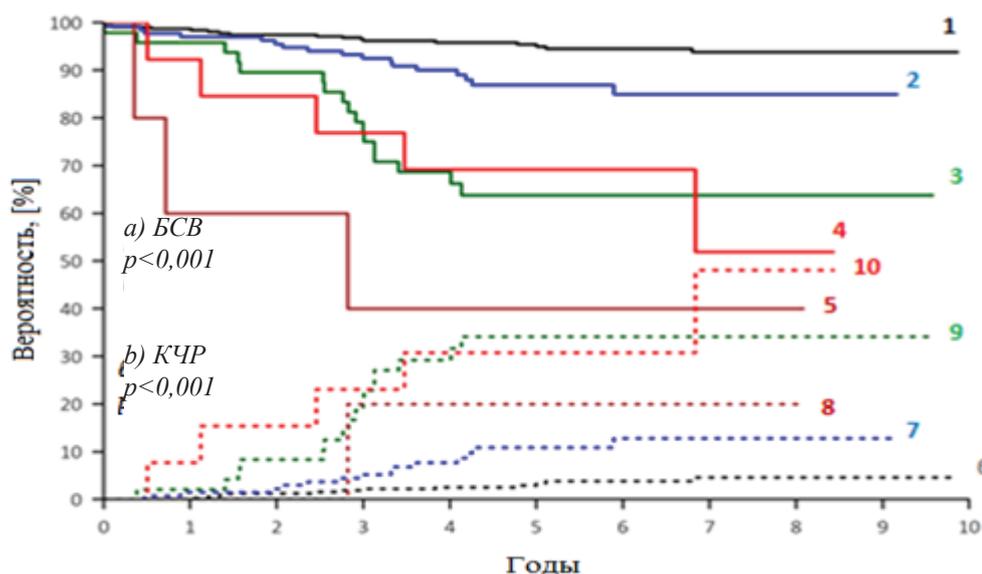


Рис. 3. БСВ (а) и КЧР (б) у пациентов с ОЛЛ, получающих лечение по протоколу ОЛЛ-МБ 2008, в зависимости от значения МОБ на 36-й день индукционной терапии (номера линий приведены в табл. 2)  
 Fig. 3. Event-free survival (a) and cumulative recurrence rate (b) of ALL patients receiving treatment according to the ALL-MB 2008 protocol depending on the MRD value on the 36th day of induction therapy

В группе 1 (пациенты со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день терапии и отрицательным значением МОБ на 36-й день терапии ( $n = 74$ )) в ППР находились 68 (91,89 %) детей, зарегистрировано 4 (5,41 %) пациента с рецидивом ОЛЛ. БСВ пациентов исследуемой группы составила  $93 \pm 3$  %, КЧР –  $6,1 \pm 3,0$  %. У пациентов со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день терапии и снижением исследуемого показателя на 36-й день терапии до  $\geq 0,01$  % ( $n = 27$ ) в ППР находились 26 (96,30 %) детей, зарегистрирован 1 (3,7 %) пациент с рецидивом ОЛЛ. БСВ составила  $96 \pm 4$  %, КЧР –  $4,3 \pm 4,3$  % (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Результаты лечения пациентов с ОЛЛ группы 1 ( $n = 101$ ) с МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии

Table 4. Treatment results of patients with ALL group 1 ( $n = 101$ ) with MRD from  $\geq 0.01$  to  $< 0.1$  % on the 15th day of therapy, depending on the status of immunophenotypic remission on the 36th day of induction therapy

Значение МОБ на 36-й день терапии, %	К-во пациентов	ППР	Рецидивы	БСВ, %	$p_{\log\text{-rank}}$	КЧР, %	$p_{\text{Gray}}$
$< 0,01$	74	68	4	$93 \pm 3$	0,8081	$6,1 \pm 3,0$	0,9632
$\geq 0,01$	27	26	1	$96 \pm 4$		$4,3 \pm 4,3$	

На рис. 4 представлены показатели БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии.

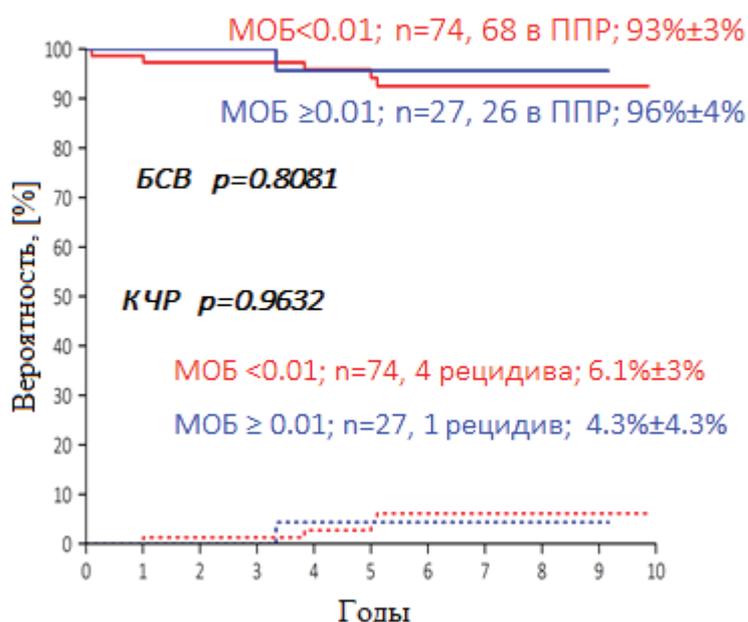


Рис. 4. БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии

Fig. 4. BSV and KCHR of ALL patients with the MRD value from  $\geq 0.01$  to  $< 0.1$  % on the 15th day of therapy depending on the status of immunophenotypic remission on the 36th day of induction therapy

В группе 2 (пациенты со значением МОБ от  $\geq 0,1$  до  $< 1$  % на 15-й день индукционной терапии и отрицательным значением МОБ на 36-й день терапии ( $n = 81$ )) в ППР находились 76 (93,83 %) детей, зарегистрировано 3 (3,7 %) пациента с рецидивом заболевания. БСВ обследуемых составила  $94 \pm 3$  %, КЧР –  $5,0 \pm 3,1$  %. У пациентов со значением МОБ от  $\geq 0,1$  до  $< 1$  % на 15-й день терапии и снижением исследуемого показателя на 36-й день терапии до значения МОБ  $\geq 0,01$  % ( $n = 52$ ) в ППР находились 45 (86,54 %) детей, зарегистрировано 6 (11,54 %) пациентов с рецидивом заболевания. БСВ обследуемых составила  $85 \pm 5$  %, КЧР –  $12,6 \pm 4,9$  % (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. Результаты лечения пациентов с ОЛЛ группы 2 ( $n = 133$ ) с МОБ от  $\geq 0,1$  до  $< 1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии

T a b l e 5. Results of treatment of ALL patients of group 2 ( $n = 133$ ) with the MRD value from  $\geq 0.1$  to  $< 1$  % on the 15th day of therapy depending on the status of immunophenotypic remission on the 36th day of induction therapy

Значение МОБ на 36-й день терапии, %	К-во пациентов	ППР	Рецидивы	БСВ, %	$p_{\log\text{-rank}}$	КЧР, %	$p_{\text{Gray}}$
$< 0,01$	81	76	3	$94 \pm 3$	0,0575	$5,0 \pm 3,1$	0,055
$\geq 0,01$	52	45	6	$85 \pm 5$		$12,6 \pm 4,9$	

На рис. 5 представлены показатели БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ со значением МОБ от  $\geq 0,1$  до  $< 1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии.

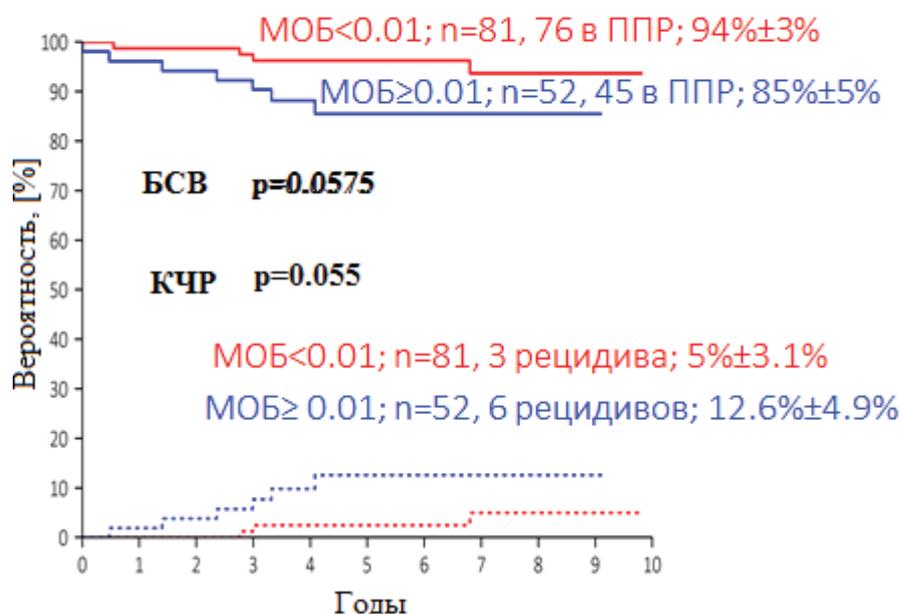


Рис. 5. БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ со значением МОБ от  $\geq 0,1$  до  $< 1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии

Fig. 5. BSV and KCHR of ALL patients with the MRD value from  $\geq 0.1$  to  $< 1$  % on the 15th day of therapy depending on the status of immunophenotypic remission on the 36th day of induction therapy

В группе 3 (пациенты с МОБ  $> 1$  % на 15-й день терапии и отрицательным значением МОБ на 36-й день терапии ( $n = 43$ )) в ППР находились 37 (86,05 %) детей, констатировано 3 (6,98 %) рецидива ОЛЛ. БСВ пациентов исследуемой группы составила  $88 \pm 5$  %, КЧР –  $27,3 \pm 4,6$  %. У пациентов со значением МОБ  $\geq 1$  % на 15-й день терапии и снижением исследуемого показателя на 36-й день терапии до значения МОБ  $\geq 0,01$  % ( $n = 118$ ) в ППР находились 83 (70,34 %) ребенка, зарегистрировано 29 (24,58 %) детей с рецидивом заболевания. БСВ пациентов составила  $68 \pm 5$  %, КЧР –  $27,3 \pm 4,6$  % (табл. 6).

Т а б л и ц а 6. Результаты лечения пациентов с ОЛЛ в группе 3 ( $n = 161$ ) с МОБ  $\geq 1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии

T a b l e 6. Results of treatment of ALL patients of group 3 ( $n = 161$ ) with the MRD value  $\geq 1$  % on the 15th day of therapy depending on the status of immunophenotypic remission on the 36th day of induction therapy

Значение МОБ на 36-й день терапии, %	К-во пациентов	ППР	Рецидивы	БСВ, %	$p_{\log\text{-rank}}$	КЧР, %	$p_{\text{Gray}}$
$< 0,01$	43	37	3	$88 \pm 5$	0,0367	$7,0 \pm 3,9$	0,0186
$\geq 0,01$	118	83	29	$68 \pm 5$		$27,3 \pm 4,6$	

На рис. 6 представлены показатели БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ со значением МОБ  $\geq 1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии.

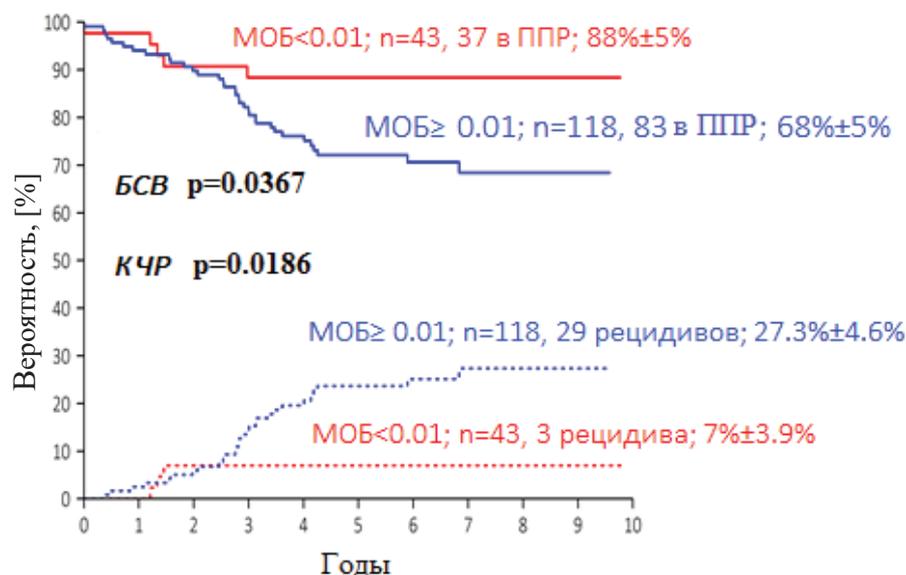


Рис. 6. БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ со значением МОБ  $\geq 1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии

Fig. 6. BSV and KCHR of ALL patients with the MRD value  $\geq 1$  % on the 15th day of therapy, depending on the status of immunophenotypic remission on the 36th day of induction therapy

**Обсуждение.** Оценка показателей МОБ среди группы пациентов со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день терапии показала отсутствие влияния статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день терапии на показатели БСВ и КЧР.

Для пациентов со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день лечения и наличием иммунофенотипической ремиссии на 36-й день терапии БСВ составила  $93 \pm 3$  %, КЧР –  $6,1 \pm 3,0$  %. У пациентов со значением МОБ от  $\geq 0,01$  до  $< 0,1$  % на 15-й день лечения и отсутствием иммунофенотипической ремиссии к 36-му дню терапии БСВ составила  $96 \pm 4$  %, КЧР –  $4,3 \pm 4,3$  %. Статистически значимой разницы в показателях БСВ ( $p = 0,8081$ ) и КЧР ( $p = 0,9632$ ) у пациентов исследуемых групп не выявлено.

Таким образом, оценка показателей МОБ на 15-й день лечения, а также определение зависимости значений МОБ на 15-й день терапии и статуса иммунофенотипической ремиссии к окончанию индукционной терапии (36-й день терапии) позволили выделить группу пациентов с низким риском рецидива заболевания (LRG). Данную группу составили пациенты со следующими значениями МОБ на 15-й день терапии:  $< 0,01$  %,  $\geq 0,01$ – $< 0,1$  %.

Среди пациентов с низким риском рецидива заболевания ( $n = 223$ ) в ППР находились 211 (94,62 %) детей, зарегистрировано 7 (3,14 %) пациентов с рецидивом ОЛЛ. БСВ пациентов исследуемой группы составила  $95 \pm 2$  %, КЧР –  $3,9 \pm 1,5$  %. Среди пациентов с показателем МОБ  $> 0,1$  % на 15-й день терапии ( $n = 294$ ) в ППР находился 241 (81,97 %) ребенок, зарегистрирован 41 (13,95 %) пациент с рецидивом заболевания. БСВ исследуемой группы пациентов составила  $81 \pm 3$  %, КЧР –  $15,8 \pm 2,4$  % (рис. 7).

Таким образом, пациенты LRG, имеющие пороговое значение МОБ  $< 0,1$  % на 15-й день терапии, характеризуются статистически значимо более высокими показателями БСВ ( $p < 0,001$ ) и более низкими показателями КЧР в сравнении с пациентами с МОБ  $> 0,1$  % на 15-й день терапии ( $p < 0,001$ ).

Сравнительный анализ значений МОБ у пациентов группы LRG и у пациентов с МОБ  $> 0,1$  % на 15-й день терапии показал статистически значимые различия в отношении показателей БСВ (95 % vs 81 %) и КЧР (3,9 % vs 15,8 %) (рис. 7).

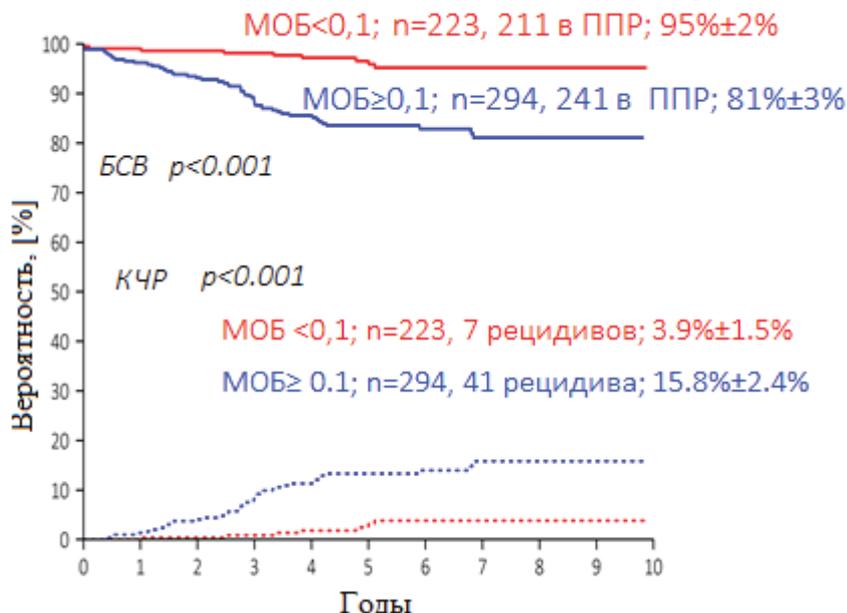


Рис. 7. БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ, получающих лечение по протоколу ОЛЛ-МВ 2008 в зависимости от значения МОБ на 15-й день индукционной терапии

Fig. 7. BSV and KChR of ALL patients who receive treatment according to the ALL-MV 2008 protocol depending on the MRD value on the 15th day of induction therapy

При анализе группы пациентов со значением  $MOB \geq 0,1$  % на 15-й день индукционной терапии выявлена зависимость показателей БСВ и КЧР от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день терапии. Так, у пациентов с  $MOB \geq 0,1$  % на 15-й день индукционной терапии и наличием иммунофенотипической ремиссии на 36-й день терапии статистически значимый показатель КЧР был более низким (КЧР –  $6,1 \pm 2,7$  %), показатель БСВ – более высоким ( $91 \pm 3$  %), чем у пациентов исследуемой группы, которые не достигли иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии (КЧР –  $23,3 \pm 3,7$  %, БСВ –  $73 \pm 4$  %) (рис. 8).

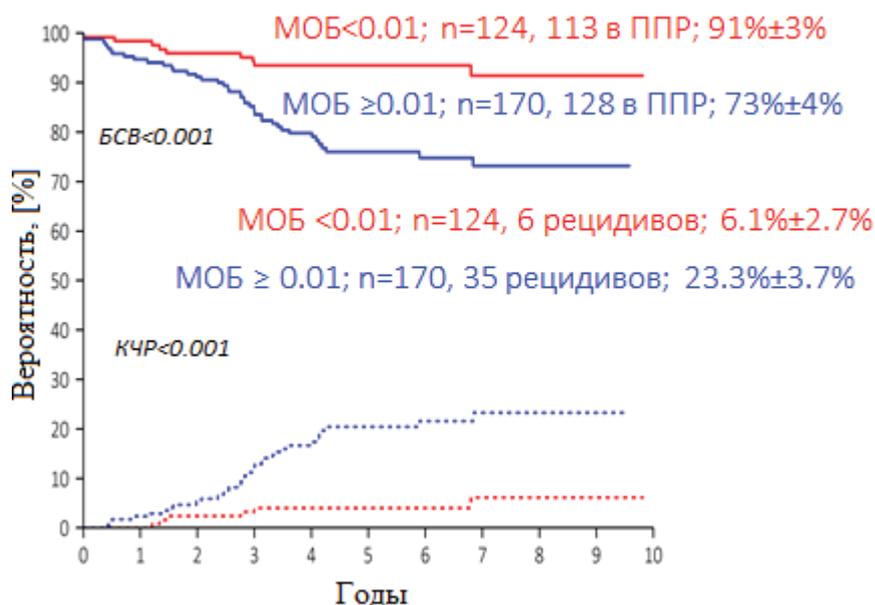


Рис. 8. БСВ и КЧР пациентов с ОЛЛ со значением МОБ от  $\geq 0,1$  до  $< 1$  % и  $MOB \geq 1$  % на 15-й день терапии в зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии на 36-й день индукционной терапии

Fig. 8. BSV and KChR of ALL patients with the MRD value  $\geq 0.1\% - < 1\%$  and  $MRD \geq 1\%$  on the 15th day of therapy depending on the status of immunophenotypic remission on the 36th day of induction therapy

**Заключение.** Таким образом, оценка зависимости значений МОБ на 15-й день терапии и статуса иммунофенотипической ремиссии к окончанию индукционной терапии (36-й день терапии) позволила выделить группу пациентов, которые характеризуются низким риском рецидива заболевания (пациенты со значением МОБ <0,1 % на 15-й день терапии), вне зависимости от статуса иммунофенотипической ремиссии к окончанию индукционной терапии.

Для пациентов с МОБ  $\geq 0,1$  % на 15-й день терапии достижение иммунофенотипической ремиссии на 36-й день терапии определяет долгосрочную выживаемость и низкий риск рецидива заболевания.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список использованных источников

1. The childhood leukemia international consortium / C. Metayer [et al.] // *Cancer Epidemiol.* – 2013. – Vol. 37, N 3. – P. 336–347. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.12.011>
2. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014 / E. Ward [et al.] // *CA: a Cancer J. Clin.* – 2014. – Vol. 64, N 2. – P. 83–103. <https://doi.org/10.3322/caac.21219>
3. Belson, M. Risk factors for acute leukemia in children: a review / M. Belson, B. Kingsley, A. Holmes // *Environ. Health Perspect.* – 2007. – Vol. 115, N 1. – P. 138–145. <https://doi.org/10.1289/ehp.9023>
4. Cools, J. Improvements in the survival of children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia / J. Cools // *Haematologica.* – 2012. – Vol. 97, N 5. – P. 635. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.068361>
5. Pui, C. H. Acute lymphoblastic leukemia / C.-H. Pui, W. E. Evans // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 339, N 9. – P. 605–615. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808273390907>
6. Cooper, S. L. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia / S. L. Cooper, P. A. Brown // *Pediatr. Clin. North Am.* – 2015. – Vol. 62, N 1. – P. 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.006>
7. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia / F. Locatelli [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, N 14. – P. 2807–2816. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-265884>
8. Lee, J. W. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia / J. W. Lee, B. Cho // *Korean J. Pediatr.* – 2017. – Vol. 60, N 5. – P. 129–137. <https://doi.org/10.3345/kjp.2017.60.5.129>
9. Teachey, D. T. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia / D. T. Teachey, S. P. Hunger // *Br. J. Haematol.* – 2013. – Vol. 162, N 5. – P. 606–620. <https://doi.org/10.1111/bjh.12442>
10. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia / G. Gaipa [et al.] // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2013. – Vol. 84, N 6. – P. 359–369. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21101>
11. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG) / K. R. Schultz [et al.] // *Blood.* – 2007. – Vol. 109, N 3. – P. 926–935. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-024729>
12. Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia / M. Lauten [et al.] // *Haematologica.* – 2012. – Vol. 97, N 7. – P. 1048–1056. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.047613>
13. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90 / M. Schrappe [et al.] // *Blood.* – 2000. – Vol. 95, N 11. – P. 3310–3322.
14. Minimal residual disease in leukaemia patients / T. Szczeпаński [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2001. – Vol. 2, N 7. – P. 409–417.
15. Campana, D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients / D. Campana // *Br. J. Haematol.* – 2003. – Vol. 121, N 6. – P. 823–838. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04393.x>
16. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies / J. J. van Dongen [et al.] // *Blood.* – 2015. – Vol. 125, N 26. – P. 3996–4009. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-580027>
17. Brüggemann, M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? / M. Brüggemann, T. Raff, M. Kneba // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, N 23. – P. 4470–4481. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-379040>
18. Chatterjee, T. Minimal residual disease detection using flow cytometry: applications in acute leukemia / T. Chatterjee, R. S. Mallhi, S. Venkatesan // *Med. J. Armed Forces India.* – 2016. – Vol. 72, N 2. – P. 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.mja-fi.2016.02.002>
19. Proposal for the standardization of flow cytometry protocols to detect minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia / M. R. V. Ikoma [et al.] // *Rev. Bras. de Hematol. Hemoter.* – 2015. – Vol. 37, N 6. – P. 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.07.012>
20. Campana, D. Minimal residual disease-guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia / D. Campana, C.-H. Pui // *Blood.* – 2017. – Vol. 129, N 4. – P. 1913–1918. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-725804>
21. Campana, D. Molecular determinants of treatment response in acute lymphoblastic leukemia / D. Campana // *Hematol. Am. Soc. of Hematol. Educ. Program.* – 2008. – Vol. 2008, N 1. – P. 366–373. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.366>
22. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study / M. J. Borowitz [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, N 12. – P. 5477–5485. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132837>

23. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group / H. Cavé [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 339, N 9. – P. 591–598. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808273390904>
24. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood / J. J. van Dongen [et al.] // *Lancet.* – 1998. – Vol. 352, N 9142. – P. 1731–1738. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04058-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04058-6)
25. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group / O. Krejci [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2003. – Vol. 32, N 8. – P. 849–851. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704241>
26. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group / P. Bader [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27, N 3. – P. 377–384. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.6065>
27. UKALL 2003, a randomised trial investigating treatment intensification for children and young adults with minimal residual disease defined high risk acute lymphoblastic leukaemia / A. J. Vora [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, N 21. – P. 136.
28. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study / V. Conter [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 115, N 16. – P. 3206–3214. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-248146>
29. Румянцев, А. Г. Результаты проспективных кооперированных исследований эффективности лечения рака у детей в России [Электронный ресурс] / А. Г. Румянцев // DOCPLAYER. – Режим доступа : <https://docplayer.ru/91149045-Rezultaty-prospektivnyh-kooperirovannyh-issledovaniy-effektivnosti-lecheniya-raka-u-detey-v-rossii.html>. – Дата доступа : 03.12.2018.

## References

1. Metayer C., Milne E., Clavel J., Infante-Rivard C., Petridou E., Taylor M. [et al.]. The childhood leukemia international consortium. *Cancer Epidemiology*, 2013, vol. 37, no. 3, pp. 336–347. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.12.011>
2. Ward E., DeSantis C., Robbins A., Kohler B., Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2014, vol. 64, no. 2, pp. 83–103. <https://doi.org/10.3322/caac.21219>
3. Belson M., Kingsley B., Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environmental Health Perspectives*, 2007, vol. 115, no. 1, pp. 138–145. <https://doi.org/10.1289/ehp.9023>
4. Cools J. Improvements in the survival of children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2012, vol. 97, no. 5, pp. 635. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.068361>
5. Pui C.-H., Evans W. E. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 1998, vol. 339, no. 9, pp. 605–615. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808273390907>
6. Cooper S. L., Brown P. A. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 2015, vol. 62, no. 1, pp. 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.006>
7. Locatelli F., Schrappe M., Bernardo M. E., Rutella S. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2012, vol. 120, no. 14, pp. 2807–2816. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-265884>
8. Lee J. W., Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean Journal of Pediatrics*, 2017, vol. 60, no. 5, pp. 129–137. <https://doi.org/10.3345/kjp.2017.60.5.129>
9. Teachey D. T., Hunger S. P. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2013, vol. 162, no. 5, pp. 606–620. <https://doi.org/10.1111/bjh.12442>
10. Gaipa G., Basso G., Biondi A., Campana D. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*, 2013, vol. 84, no. 6, pp. 359–369. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21101>
11. Schultz K. R., Pullen D. J., Sather H. N., Shuster J. J., Devidas M., Borowitz M. J. [et al.]. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*, 2007, vol. 109, no. 3, pp. 926–935. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-024729>
12. Lauten M., Möricke A., Beier R., Zimmermann M., Stanulla M., Meissner B. [et al.]. Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia. *Haematologica*, 2012, vol. 97, no. 7, pp. 1048–1056. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.047613>
13. Schrappe M., Reiter A., Ludwig W. D., Harbott J., Zimmermann M., Hiddemann W. [et al.]. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. *Blood*, 2000, vol. 95, no. 11, pp. 3310–3322.
14. Szczepański T., Orfão A., van der Velden V. H., San Miguel J. F., van Dongen J. J. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncology*, 2001, vol. 2, no. 7, pp. 409–417.
15. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *British Journal of Haematology*, 2003, vol. 121, no. 6, pp. 823–838. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04393.x>
16. van Dongen J. J., van der Velden V. H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*, 2015, vol. 125, no. 26, pp. 3996–4009. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-580027>
17. Brüggemann M., Raff T., Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood*, 2012, vol. 120, no. 23, pp. 4470–4481. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-379040>

18. Chatterjee T., Mallhi R. S., Venkatesan S. Minimal residual disease detection using flow cytometry: applications in acute leukemia. *Medical Journal Armed Forces India*, 2016, vol. 72, no. 2, pp. 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2016.02.002>
19. Ikoma M. R.V., Beltrame M. P., Ferreira S. I., Souto E. X., Malvezzi M., Yamamoto M. Proposal for the standardization of flow cytometry protocols to detect minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2015, vol. 37, no. 6, pp. 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.07.012>
20. Campana D., Pui C.-H. Minimal residual disease-guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2017, vol. 129, no. 4, pp. 1913–1918. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-725804>
21. Campana D. Molecular determinants of treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2008, no. 1, pp. 366–373. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1>
22. Borowitz M. J., Devidas M., Hunger S. P., Bowman W. P., Carroll A. J., Carroll W. L. [et al.]. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 12, pp. 5477–5485. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132837>
23. Cavé H., van der Werff ten Bosch J., Suci S., Guidal C., Waterkeyn C., Otten J. [et al.]. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. *New England Journal of Medicine*, 1998, vol. 339, no. 9, pp. 591–598. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808273390904>
24. Van Dongen J. J., Seriu T., Panzer-Grümayer E. R., Biondi A., Pongers-Willems M. J., Corral L. [et al.]. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*, 1998, vol. 352, no. 9142, pp. 1731–1738. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04058-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04058-6)
25. Krejci O., van der Velden V. H., Bader P., Kreyenberg H., Goulden N., Hancock J. [et al.]. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplantation*, 2003, vol. 32, no. 8, pp. 849–851. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704241>
26. Bader P., Kreyenberg H., Henze G. H., Eckert C., Reising M., Willasch A. [et al.]. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, vol. 27, no. 3, pp. 377–384. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.6065>
27. Vora A. J., Goulden N., Mitchell C. D., Hough R., Rowntree C., Richards S. M. UKALL 2003, a randomised trial investigating treatment intensification for children and young adults with minimal residual disease defined high risk acute lymphoblastic leukaemia. *Blood*, 2012, vol. 120, no. 21, pp. 136–136.
28. Conter V., Bartram C. R., Valsecchi M. G., Schrauder A., Panzer-Grümayer R., Möricke A. [et al.]. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*, 2010, vol. 115, no. 16, pp. 3206–3214. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-248146>
29. Rummyantsev A. G. *Results of prospective cooperative studies of the effectiveness of cancer treatment in children in Russia*. Available at: <https://docplayer.ru/91149045-Rezultaty-prospektivnyh-kooperirovannyh-issledovaniy-effektivnosti-lecheniya-raka-u-detey-v-rossii.html> (accessed 7 February 2011) (in Russian).

### Информация об авторах

*Столярова Елена Александровна* – врач-гематолог. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: EA.Stolyarova@yandex.ru

*Мигаль Наталья Владимировна* – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: migaldanuta1@yandex.ru

*Белевцев Михаил Владимирович* – канд. биол. наук, доцент, заместитель директора. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: belevtsev@mail.ru

*Мовчан Людмила Викторовна* – канд. биол. наук, врач-иммунолог. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: movchan-1@mail.ru

### Information about the authors

*Elena A. Stolyarova* – Hematologist. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: EA.Stolyarova@yandex.ru

*Nataliya V. Migal* – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Head of the Department. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: migaldanuta1@yandex.ru

*Mikhail V. Belevtsev* – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor, Deputy Director. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus).

*Ludmila V. Movchan* – Ph. D. (Biol.), Immunologist. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus).

*Oleg I. Budanov* – Medical statistic. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: budanov@oncology.by

*Буданов Олег Иванович* – мед. статистик. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: budanov@oncology.by

*Попов Александр Михайлович* – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева (ул. Саморы Машела, 1, 117997, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: uralcytometry@gmail.com

*Фечина Лариса Геннадьевна* – канд. мед. наук, руководитель отдела, заместитель глав. врача. Областная детская клиническая больница № 1 (ул. С. Дерябиной, 32, 620149, г. Екатеринбург, Российская Федерация). E-mail: childrens\_oncology@mail.ru

*Алейникова Ольга Витальевна* – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, директор. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: aleinikova2004@mail.ru

*Aleksandr M. Popov* – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev (1, Zamora Machel Str., 117997, Moscow, Russian Federation). E-mail: uralcytometry@gmail.com

*Larisa G. Fechina* – Ph. D. (Med.), Head of the Department, Deputy Chief Doctor. Regional Children's Clinical Hospital no. 1 (32, Serafima Deryabina Str., 620149, Yekaterinburg, Russian Federation). E-mail: childrens\_oncology@mail.ru

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

ISSN 1814-6023 (Print)  
ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 614.875:537.872:52-77+599.323.4+591.3:591.463.1  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-216-225>

Поступила в редакцию 03.03.2019  
Received 03.03.2019

**Н. В. Чуешова<sup>1</sup>, Ф. И. Висмонт<sup>2</sup>, И. А. Чешик<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь*  
<sup>2</sup>*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*

## **ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ОТ МОБИЛЬНОГО ТЕЛЕФОНА (1745 МГц) НА СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС-САМЦОВ В ПЕРИОД ИХ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ**

**Аннотация.** Проведена комплексная оценка морфофункциональных изменений в репродуктивной системе крыс-самцов нескольких возрастных групп, начиная с препубертатного периода (50–52 дня) и до достижения ими половозрелого возраста (4,5 мес.), подверженных воздействию низкоинтенсивного электромагнитного излучения (ЭМИ) от мобильного телефона (МТ) (1745 МГц, плотность потока энергии 0,2–20 мкВт/см<sup>2</sup>).

Установлено, что воздействие ЭМИ от МТ (на протяжении 7 сут) на организм крыс-самцов в период их полового созревания приводит к изменениям в развивающейся репродуктивной системе, характеризующимся увеличением массы эпидидимисов и семенных пузырьков, развитием дегенеративных изменений в семенниках в виде угнетения пролиферативной активности и активацией дифференцировки клеток сперматогенного эпителия – сперматид. Эти изменения сопровождаются значительным увеличением количества эпидидимальных сперматозоидов (раннее половое созревание) и снижением их жизнеспособности на фоне уменьшения концентрации тестостерона в сыворотке крови. Напротив, длительное (на протяжении 60 и 90 сут) воздействие ЭМИ от МТ на организм крыс-самцов начиная с раннего пубертатного периода и до достижения ими половозрелого возраста характеризуется слабо выраженной реакцией сперматогенного эпителия, но значительным снижением количества сперматозоидов и их жизнеспособности, а также увеличением концентрации тестостерона в сыворотке крови.

Комплекс выявленных морфофункциональных нарушений в репродуктивной системе крыс-самцов свидетельствует об угнетении ее функции в условиях воздействия низкоинтенсивного ЭМИ от МТ, что может быть фактором, влияющим на снижение мужской фертильности.

**Ключевые слова:** электромагнитное излучение, мобильный телефон, репродуктивная система крыс-самцов, сперматогенез, сперматозоиды, жизнеспособность, фрагментация ДНК сперматозоидов, тестостерон

**Для цитирования:** Чуешова, Н. В. Влияние электромагнитного излучения от мобильного телефона (1745 МГц) на состояние репродуктивной системы крыс-самцов в период их постнатального развития / Н. В. Чуешова, Ф. И. Висмонт, И. А. Чешик // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 216–225. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-216-225>

**N. V. Chueshova<sup>1</sup>, F. I. Vismont<sup>2</sup>, I. A. Cheshyk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus*  
<sup>2</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

## **EFFECT OF ELECTROMAGNETIC RADIATION FROM A MOBILE PHONE (1745 MHz) ON THE CONDITION OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE RATS DURING THEIR POSTNATAL DEVELOPMENT**

**Abstract.** A comprehensive assessment of the morphofunctional changes in the reproductive system of male rats of several age groups was carried out, starting from the prepubertal period (50–52 days) and until they reach puberty (4,5 months) under the conditions of exposure to low-intensity electromagnetic radiation from a mobile phone (EMR MP, 1745 MHz, power density of 0.2–20  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ).

It was established that the nature of the revealed morphofunctional changes in the reproductive system of male rats exposed to low-intensity EMR from MT largely depends on the exposure duration and the age of animals.

The impact of EMR from MT (for 7 days) on the body of male rats during puberty leads to significant changes in the developing reproductive system. Namely, against the background of an increase in the mass of epididymis and seminal vesicles, the development of degenerative changes in the testes was revealed, manifested by the inhibition of the proliferative activity and the activation of differentiation of spermatogenic epithelial cells – spermatids, which is accompanied by a significant increase in the number of epididymal spermatozoa (early puberty), while their viability decreases and serum testosterone concentrations increase. On the contrary, the prolonged (for 60 and 90 days) exposure of EMR from MT to the

organism of male rats from the early puberty period and until they reach puberty is characterized by a weakly expressed spermatogenic epithelium reaction, but also the most characteristic decrease in the number and viability of spermatozoa, as well as by the increase in concentration of testosterone in blood serum.

The complex of identified disorders in the morphofunctional state of the reproductive system of male rats indicates the inhibition of its function under the influence of low-intensity EMR from MT, which may be a factor affecting the decline in male fertility.

**Keywords:** electromagnetic radiation, mobile phone, reproductive system of male rats, spermatogenesis, spermatozoa, viability, sperm DNA fragmentation, testosterone

**For citation:** Chueshova N. V., Vismont F. I., Cheslyk I. A. Effect of electromagnetic radiation from a mobile phone (1745 MHz) on the condition of the reproductive system of male rats during their postnatal development. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 216–225 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-216-225>

**Введение.** Интенсивное проникновение все новых антропогенных источников электромагнитных полей (ЭМП) в повседневную жизнь человека привело к формированию нового фактора загрязнения окружающей среды – электромагнитного [1]. Однако достижения в области технологии, сопровождающиеся все возрастающими интенсивностью и частотой излучаемых электромагнитных волн, не учитывают последствий воздействия последних на здоровье человека [2].

Одним из основных источников электромагнитного излучения (ЭМИ), действующего на организм человека, является широко используемая подвижная сотовая радиосвязь. Как источник неионизирующего излучения она действует на все слои населения, включая новорожденных, детей, беременных женщин и лиц пожилого возраста [3]. Несмотря на низкую интенсивность этого излучения, воздействие которого носит нетепловой характер [4], оно обладает высокой биологической активностью и способно вызывать нарушения в нервных структурах головного мозга и рецепторах слухового и вестибулярного анализаторов, а также повышает риск развития онкологических заболеваний в мозге [2]. В связи с этим в 2011 г. Международное агентство исследования рака ВОЗ (IARC) классифицировало ЭМП сотовых телефонов как возможный канцерогенный фактор для людей (группа канцерогенной опасности 2B) [5]. Согласно предварительным результатам Национальной токсикологической программы (National toxicology program, США), развитие раковых опухолей сердца и в меньшей степени мозга и надпочечников отмечается у крыс-самцов, подвергшихся воздействию высокого уровня радиочастотного излучения, сопоставимого с сотовой связью стандартов 2G и 3G [6].

В настоящее время растет обеспокоенность в связи с наблюдаемым повышением доли мужского бесплодия (до 45 % в бесплодном браке), которое во многом является следствием снижения качества и концентрации спермы. Известно также о негативном влиянии на процесс сперматогенеза и таких факторов, как стресс, курение, ионизирующая радиация и химические вещества [7]. К настоящему времени проведены многочисленные исследования по изучению эффектов воздействия ЭМИ от мобильного телефона (МТ) на репродуктивную систему [8], однако результаты их весьма противоречивы. В то же время в большинстве работ показано, что воздействие данного вида излучения приводит к дегенеративным изменениям сперматогенного эпителия, снижению параметров сперматозоидов, изменению андрогенного статуса [9, 10]. Учитывая повсеместность использования МТ как взрослым населением, так и детьми школьного возраста, представляется актуальным изучение длительного влияния низкоинтенсивного ЭМИ, генерируемого МТ, на морфофункциональное состояние мужской репродуктивной системы начиная с периода ее формирования.

Цель настоящей работы – комплексная оценка морфофункциональных изменений в репродуктивной системе крыс-самцов начиная с периода ее формирования и развития (50–52 дня) и до достижения ими половозрелого возраста (4,5 мес.) в условиях воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения от мобильного телефона (1745 МГц).

**Материалы и методы исследования.** Исследования выполнены на 120 белых крысах-самцах беспородной линии (исходный генотип Wistar) в возрасте 50–52 сут и массой  $139,0 \pm 5,9$  г на начало эксперимента. Все животные ( $n = 60$ ) были разделены на две группы: 1 – контроль; 2 – животные, подвергнутые воздействию ЭМИ от МТ на протяжении 90 сут. Анализ состояния репродуктивной системы крыс-самцов проводили на 1-е и 30-е сутки после прекращения воздей-

ствия ЭМИ от МТ на протяжении 1, 7, 30, 60 и 90 сут. Каждой экспериментальной группе ( $n = 6$ ) соответствовал контроль – животные аналогичного возраста ( $n = 6$ ).

Все животные, согласно «Стандартным правилам по упорядочению, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник (вивариев)», содержались в одинаковых стандартных условиях вивария Государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси».

Исследования выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с животными с соблюдением рекомендаций и требований «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 г), Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996) и ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь (№ 56 от 28.03.2008 г).

Источником ЭМИ был МТ, подключенный к компьютеру с сервисной программой WinTesla, позволяющей управлять его работой. Условия облучения животных: несущая частота 1745 МГц, 8 ч/сут, фракциями по 30 мин с интервалом в 5 мин, в режиме имитации разговора, т. е. уровень излучения был близок по своим характеристикам к ЭМИ МТ стандарта GSM-1800, воздействующему на пользователя при разговоре. Телефон был размещен в центральной части рабочей зоны ( $1 \times 0,7$  м), в которой находились 4 пластиковые клетки с животными. Измеряемая прибором ПЗ-41 плотность потока электромагнитной энергии (ППЭ) в клетке находилась в пределах  $0,2–20,0$  мкВт/см<sup>2</sup> (в зависимости от удаленности от антенны МТ), составляя в среднем  $7,5 \pm 0,3$  мкВт/см<sup>2</sup>.

На 1-е и 30-е сутки после прекращения воздействий в течение 1, 7, 30, 60 и 90 сут предварительно взвешенных животных декапитировали, после чего производили забор крови, выделяли семенники, эпидидимисы и семенные пузырьки. Содержание тестостерона в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ООО «Хема-Медика», РФ), используя микропланшетный фотометр TECAN SAFEIRE (Австралия). Массу репродуктивных органов измеряли на аналитических весах (Ohaus EX, Швейцария) с точностью до 0,1 мг.

Источником сперматогенных клеток являлся левый семенник, который освобождали от туники и кровеносных сосудов и получали суспензию клеток, как описано ранее в работе [11]. Для определения их количества использовали метод проточной цитометрии (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США). Различные типы половых клеток, выявленных с помощью соответствующей интенсивности флуоресценции содержащейся в них ДНК, были обозначены как С. В качестве диплоидного стандарта использовали лейкоциты периферической крови. По содержанию ДНК клетки были классифицированы как сперматогонии (2С), прелептотенные сперматоциты (сперматоциты в S-фазе), сперматоциты I порядка (4С), круглые (1С), удлиненные (HC1) и продолговатые сперматиды (HC2).

Сперматозоиды выделяли из эпидидимиса, подсчитывали их количество в камере Горяева [12] и методом суправитального окрашивания эозин-нигрозином определяли их жизнеспособность [13]. Структуру хроматина сперматозоидов на наличие одно- и двухцепочечных разрывов цепи ДНК анализировали путем окрашивания акридиновым оранжевым, используя метод SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), приведенный в работе [14]. Количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК подсчитывали на проточном цитометре.

В связи с тем что в литературе имеются данные о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания уровня ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, опыты проводили в строго определенное время – с 8.30 до 12.00.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами биологической статистики, используя пакеты программ Excel и GraphPad Prism 5. При сравнении двух независимых групп по количественному признаку использовали критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney test). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки менее 5 % ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что воздействие низкоинтенсивного ЭМИ от МТ на протяжении 1-х суток не повлияло на массу органов репродуктивной системы (см. таблицу).

Напротив, по окончании 7-дневного (кратковременного) воздействия у экспериментальных животных обнаружено увеличение абсолютной массы эпидидимисов и семенных пузырьков на 38,5 и 100,0 % соответственно ( $p < 0,05$ ).

**Масса репродуктивных органов крыс-самцов на 1-е и 30-е сутки после прекращения воздействия ЭМИ от МТ в течение 1, 7, 30, 60 и 90 сут**

**Mass of reproductive organs of male rats on the 1<sup>st</sup> and 30<sup>th</sup> days after the cessation of exposure to EMR from MP during the 1, 7, 30, 60 and 90 days**

Репродуктивные органы	1-е сутки после прекращения воздействия		30-е сутки после прекращения воздействия	
	Контроль	ЭМИ	Контроль	ЭМИ
1-е сутки воздействия ЭМИ				
Семенники	0,60 ± 0,09	0,54 ± 0,13	1,37 ± 0,06	1,38 ± 0,05
Эпидидимисы	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,34 ± 0,01
Семенные пузырьки	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,02	1,05 ± 0,17	1,00 ± 0,06
7-е сутки воздействия ЭМИ				
Семенники	0,89 ± 0,07	1,05 ± 0,06	1,39 ± 0,05	1,29 ± 0,05
Эпидидимисы	0,13 ± 0,01	0,18 ± 0,01*	0,38 ± 0,01	0,34 ± 0,03
Семенные пузырьки	0,13 ± 0,01	0,26 ± 0,03*	1,04 ± 0,06	0,80 ± 0,10
30-е сутки воздействия ЭМИ				
Семенники	1,32 ± 0,05	1,51 ± 0,06*	1,48 ± 0,07	1,37 ± 0,03
Эпидидимисы	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,42 ± 0,01
Семенные пузырьки	0,70 ± 0,03	0,76 ± 0,08	1,17 ± 0,04	0,97 ± 0,07*
60-е сутки воздействия ЭМИ				
Семенники	1,32 ± 0,03	1,50 ± 0,04*	1,63 ± 0,05	1,55 ± 0,04
Эпидидимисы	0,37 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,47 ± 0,01
Семенные пузырьки	0,90 ± 0,05	0,87 ± 0,04	1,37 ± 0,07	1,13 ± 0,09
90-е сутки воздействия ЭМИ				
Семенники	1,61 ± 0,08	1,63 ± 0,03	1,43 ± 0,05	1,66 ± 0,07*
Эпидидимисы	0,48 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,52 ± 0,04
Семенные пузырьки	1,16 ± 0,08	1,34 ± 0,08	1,65 ± 0,07	1,69 ± 0,20

Примечание. \* – статистически значимые отличия от контроля ( $p < 0,05$ ).

Повышение массы репродуктивных органов сохранялось и при 30-дневном (продолжительном) воздействии, но статистически значимое для семенников, масса которых увеличивалась на 14,4 % при сравнении с таковой у необлученных животных.

Длительное пребывание в ЭМП МТ на протяжении 60 сут приводило к повышению массы семенников на 13,6 % ( $p < 0,05$ ), в то время как более продолжительное электромагнитное воздействие (до 90 сут) сказывалось на увеличении массы как эпидидимисов, так и семенников и семенных пузырьков (обнаруженные изменения были статистически не значимыми).

В отдаленном периоде (30-е сутки) после прекращения электромагнитного воздействия для всех изучаемых сроков отмечено восстановление массы органов репродуктивной системы, за исключением статистически значимого снижения массы семенных пузырьков и возрастание веса семенников на 17,1 и 16,1 % соответственно в условиях экспозиции 30 и 90 сут.

Выявленные особенности изменений в распределении сперматогенных клеток различных популяций указывают на различную реакцию сперматогенного эпителия при воздействии ЭМИ МТ, которая зависит от длительности облучения (рис. 1). Так, если на 1-е сутки после однодневного облучения наблюдалось снижение продолговатых сперматид на 42,1 % (угнетение на завершающем этапе сперматогенеза,  $p < 0,05$ ), то при 7- и 30-суточном воздействии выявлены более значимые и однонаправленные изменения, характеризующие угнетение пролиферирующей активности сперматогенного эпителия, что проявлялось снижением количества сперматогоний на 25,7 и 22,0 % соответственно ( $p < 0,05$ ) и активацией дифференцировки клеток, а именно увеличением количества продолговатых сперматид на 87,7 и 23,3 % ( $p < 0,05$ ). Спустя 30 сут после

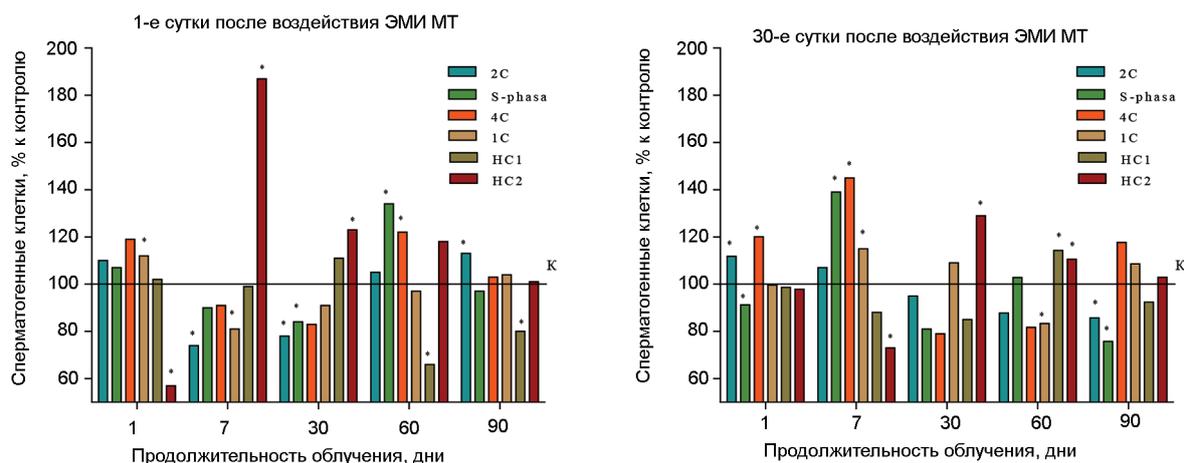


Рис. 1. Количество сперматогенных клеток различных популяций на 1-е и 30-е сутки после прекращения воздействия ЭМИ от МТ на протяжении 1, 7, 30, 60 и 90 сут. К – линия контроля. \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

Fig. 1. Number of spermatogenic cells of different populations of the test tissue of male rats on the 1st and 30th day after the cessation of exposure to EMR from MP for 1, 7, 30, 60 and 90 days. K – control line. \* – statistically significant differences when compared with the control ( $p < 0.05$ )

прекращения кратковременного (1 и 7 сут) воздействия установлено увеличение числа клеток на начальном этапе сперматогенеза, что указывает на восстановление сперматогенного цикла. Тем не менее, значительное снижение количества продолговатых сперматид на 27,0 % в отдаленный период после прекращения воздействия ЭМИ от МТ в течение 7 сут может свидетельствовать о нарушении регуляции синтеза белков – факторов роста (эпидермальный, инсулиноподобные, трансформирующие факторы роста), ответственных за эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов пролиферации и дифференцировки клеток [15].

Установлено, что длительное воздействие на протяжении 60 и 90 сут сопровождается однонаправленными изменениями в количественном распределении сперматогенных клеток (рис. 1). Обнаруженное увеличение количества клеток начального звена сперматогенеза, таких как сперматоциты в S-фазе и сперматоциты I порядка на 22,5 и 34,1 % ( $p < 0,05$ ) при 60-дневном воздействии, а также сперматогоний на 13,6 % ( $p < 0,05$ ) при 90-дневном облучении, можно рассматривать как компенсаторную реакцию сперматогенного эпителия на уменьшение количества удлиненных сперматид, клеток завершающего этапа сперматогенеза на 43,8 и 19,8 % соответственно ( $p < 0,05$ ) при 60- и 90-дневном воздействии. Спустя 30 сут после прекращения 90-дневной экспозиции в ЭМП МТ обнаружено снижение количества сперматогоний и сперматоцит в прелептотене на 14,3 и 24,3 %, что указывает на угнетение начального этапа сперматогенеза. Данный факт свидетельствует о уязвимости пролиферирующих клеток (сперматогоний) сперматогенного эпителия к электромагнитному излучению в отдаленном периоде после прекращения облучения.

Анализ продукции спермиогенеза, оцениваемый по количеству эпидидимальных сперматозоидов, показал их отсутствие у крыс-самцов после однодневной экспозиции и у контрольных животных в связи с их возрастом (рис. 2). В то же время установлено, что относительно кратковременное облучение в течение 7 сут оказывает стимулирующее влияние на репродуктивную систему облученных крыс-самцов, что отразилось на продукции зрелых половых клеток: их число было значительно выше (на 216 %), чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). Это коррелирует с выявленным ростом количества продолговатых сперматид в тестикулярной ткани, что можно рассматривать как преждевременное половое созревание. По мнению N. Zareen [16], преждевременное половое созревание является результатом инициации функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, проявляющийся ранним сперматогенезом.

Установлено, что воздействие ЭМИ от МТ на протяжении 30 и 60 сут привело к повышению количества сперматозоидов до 130,5 и 109,1 %, и, напротив, у крыс-самцов в условиях 90-днев-

ной экспозиции данный показатель был ниже на 8,0 %, чем в группе необлученных животных, но эти изменения не носили статистически значимого характера.

В отдаленный период после прекращения электромагнитного воздействия различной продолжительности на 30-е сутки обнаружено снижение количества зрелых половых клеток, но статистически значимым оно было лишь для 60-дневной экспозиции (на 13,3 % при сравнении с контрольным значением). Интересным представляется выявленное в этот период снижение количества сперматозоидов на 23,9 % после 7-дневной экспозиции, несмотря на то что на 1-е сутки после прекращения облучения их число значительно превышало контрольный уровень (рис. 2).

Жизнеспособность эпидидимальных сперматозоидов на 1-е сутки после прекращения электромагнитной экспозиции на протяжении от 1 до 90 сут значительно снижалась, и в подавляющем большинстве опытов это снижение носило статистически значимый характер (рис. 2). Максимальное снижение этого показателя составляло 29,2 и 34,0 % соответственно ( $p < 0,05$ ) после 7- и 60-дневного облучения. На 30-е сутки после прекращения облучения животных в течение 7 и 60 сут жизнеспособность сперматозоидов оставалась сниженной и составляла 79,5 и 82,5 % ( $p < 0,05$ ) при сравнении с контрольным уровнем.

В настоящее время анализ спермального хроматина на наличие одно- и двунитевых разрывов ДНК позволяет судить об оплодотворяющей способности половой клетки [14]. Полученные нами данные свидетельствуют об отсутствии изменений данного показателя на 1-е сутки после кратковременного (1, 7 и 30 сут) и длительного (60 и 90 сут) электромагнитного облучения. Однако спустя 30 сут обнаружено статистически значимое увеличение (на 19,0 %) фрагментации ДНК в сперматозоидах экспериментальных животных.

Известно, что размеры и нормальное функционирование половых органов зависят от уровня тестостерона. В эксперименте получены данные, которые позволили оценить динамику содержания тестостерона в сыворотке крови, секреция которого указывает на работу гормонпродуцирующих интерстициальных клеток Лейдига и, соответственно, на их чувствительность к воздействию ЭМИ от МТ. Так, установлено снижение концентрации тестостерона в сыворотке крови экспериментальных животных на 1-е и 30-е сутки после 30-дневной экспозиции на 42,5 и 75,8 % соответственно ( $p < 0,05$ ) при сравнении с группой необлученных животных (рис. 2). Напротив, на 30-е сутки после 1-дневного воздействия ЭМИ от МТ установлено статистически значимое увеличение данного показателя на 104,9 % ( $p < 0,05$ ). Концентрация тестостерона на 1-е сутки после 60 сут облучения также повысилась – на 156,6 % ( $p < 0,05$ ), а спустя 30 сут после 90 дней экспозиции – на 200,1 % ( $p < 0,05$ ).

Необходимо отметить, что большинство исследователей считают, что угнетение секреции тестостерона под влиянием ЭМИ от МТ объясняется снижением количества гормонпродуцирующих клеток Лейдига [17]. Однако ряд авторов [18, 19] пришли к заключению, что воздействие ЭМИ от МТ (GSM 1800 МГц), допустимый уровень которого ниже максимально рекомендованного ICNIRP (2,0 Вт/кг), вызывает повышение уровня тестостерона, что и установлено нами при длительном экспонировании животных.

Предполагается, что основным механизмом метаболических изменений в клетках при действии ЭМИ мобильной связи является процесс, получивший название «окислительный стресс». Под действием ЭМП могут изменяться скорость диффузии через биологические мембраны, ориентация и конфирмация биологических макромолекул, вследствие чего отмечается избыточное образование свободных радикалов в клетке, которые в свою очередь вызывают повреждения клеточных компонентов [9, 20].

Таким образом, нами установлен ряд изменений в состоянии репродуктивной системы неполовозрелых животных, подвергнутых воздействию ЭМИ, генерируемого МТ, которые можно охарактеризовать как инициацию сперматогенного процесса, проявляющегося ранним сперматогенезом – преждевременным половым созреванием. Анализ изменений морфофункционального состояния репродуктивной системы крыс-самцов, подвергнутых длительному воздействию ЭМИ, указывает на угнетение пролиферирующей активности сперматогенного эпителия в отдаленном периоде. По мнению М. Markov с соавт. [21], несмотря на то что ЭМИ от МТ низкоинтенсивное, его повторное или длительное воздействие носит кумулятивный характер и опосредова-

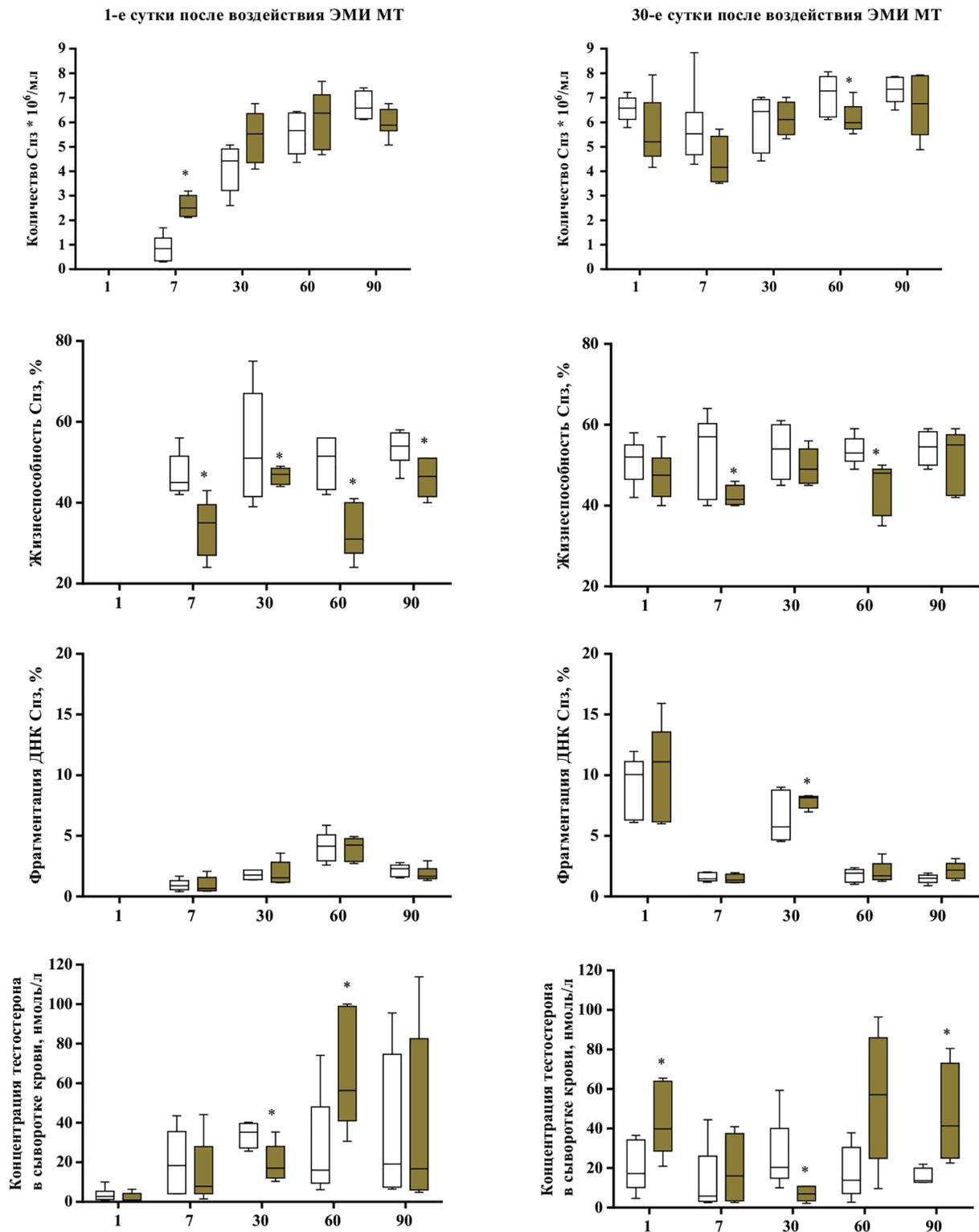


Рис. 2. Количество, жизнеспособность, фрагментация ДНК эпидидимальных сперматозоидов, а также концентрация тестостерона в сыворотке крови крыс-самцов на 1-е и 30-е сутки после прекращения влияния ЭМИ от МТ на протяжении 1, 7, 30, 60 и 90 сут. Данные представлены как медиана, интерквантильный интервал 25–75 % (min–max);

\* – статистически значимые различия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$

Fig. 2. The number, viability, DNA fragmentation of epididymal spermatozoa, as well as the serum testosterone concentration in male rats on the 1st and 30th days after the cessation of the influence of EMR from MT for 1, 7, 30, 60 and 90 days. Data are presented as median, inter-quantile range 25–75 % and span min–max; \* – statistically significant differences when compared with the control at  $p < 0.05$

но через нервно-эндокринную систему, способно оказывать влияние на функциональную активность органов и тканей организма. Другими словами, развитие патологических изменений в организме при длительном использовании МТ связано с накопительными процессами нарушений в регуляторных системах, что необходимо учитывать при разработке соответствующих стандартов.

Тем не менее, полученные нами данные дают основание утверждать, что ЭМИ от МТ является потенциально негативным фактором в отношении мужской репродуктивной системы, особенно в период ее формирования и развития.

**Заключение.** Характер выявленных нами морфофункциональных изменений в репродуктивной системе крыс-самцов в условиях воздействия низкоинтенсивного ЭМИ от МТ (1745 МГц, ППЭ = 0,2–20 мкВт/см<sup>2</sup>,  $\tilde{x}_{\text{ППЭ}} = 7,5 \pm 0,3$  мкВт/см<sup>2</sup>) в значительной мере зависит от длительности экспозиции и возраста животных.

Воздействие ЭМИ от МТ на организм крыс-самцов в период полового созревания приводит к морфофункциональным изменениям в развивающейся репродуктивной системе, характеризующимся увеличением массы эпидидимисов и семенных пузырьков, развитием дегенеративных изменений в семенниках, проявляющихся угнетением пролиферативной активности и активацией дифференцировки клеток сперматогенного эпителия – сперматид. Эти изменения сопровождаются значительным увеличением количества эпидидимальных сперматозоидов (преждевременное половое созревание) и снижением их жизнеспособности на фоне падения концентрации тестостерона в сыворотке крови.

Длительное (на протяжении 60 и 90 сут) воздействие ЭМИ от МТ на организм крыс-самцов половозрелого возраста характеризуется слабо выраженной реакцией сперматогенного эпителия. Наиболее характерные нарушения при длительном влиянии ЭМИ от МТ – снижение количества сперматозоидов и их жизнеспособности, а также увеличение концентрации тестостерона в сыворотке крови.

Таким образом, характер морфофункциональных изменений в репродуктивной системе крыс-самцов свидетельствует об угнетении генеративной функции в условиях воздействия низкоинтенсивного ЭМИ от МТ, что дает основание полагать о влиянии данного фактора на снижение мужской фертильности.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список использованных источников

1. Кудряшов, Ю. Б. Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения: учебник для вузов / Ю. Б. Кудряшов, Ю. Ф. Перов, А. Б. Рубин. – М. : Физматлит, 2008. – 181 с.
2. Григорьев, Ю. Г. От электромагнитного смога до электромагнитного хаоса. К оценке опасности мобильной связи для здоровья населения / Ю. Г. Григорьев // Мед. радиология и радиац. безопасность. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 28–33.
3. Стожаров, А. Н. Медицинская экология: учеб. пособие / А. Н. Стожаров. – Минск : Выш. шк., 2007. – 368 с.
4. Case-control study of the association between malignant brain tumours diagnosed between 2007 and 2009 and mobile and cordless phone use / L. Hardell [et al.] // Int. J. Oncol. – 2013. – Vol. 43, N 6. – P. 1833–1845. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2111>
5. IARC classifies radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans // IARC Press Release / WHO. – 2011. – N 208. – 6 p.
6. Report of partial findings from the national toxicology program carcinogenesis studies of cell phone radiofrequency radiation in Hsd: Sprague dawley® SD rats (whole body exposure) / M. Wyde [et al.] // BioRxiv. – 2018. – 87 p. <https://doi.org/10.1101/055699>
7. Brody, S. A. Мужское бесплодие и окислительный стресс: роль диеты, образа жизни и пищевых добавок / S. A. Brody // Андрология и генитальная хирургия. – 2014. – Т. 15, № 3. – С. 33–41.
8. Верещако, Г. Г. Влияние электромагнитного излучения мобильных телефонов на состояние мужской репродуктивной системы и потомство / Г. Г. Верещако. – Минск : Беларус. навука, 2015. – 186 с.
9. Hamada, A. J. Cell phones and their impact on male fertility: fact or fiction / A. J. Hamada, A. Singh, A. Agarwal // Open Reprod. Sci. J. – 2011. – Vol. 5. – P. 125–137. <https://doi.org/10.2174/1874255601103010125>
10. Хорсева, Н. И. Влияние низкоинтенсивных электромагнитных полей на антенатальный период развития организма. Часть 1. От гаметогенеза до родов (обзор) / Н. И. Хорсева, Ю. Г. Григорьев, П. Е. Григорьев // Журн. мед.-биол. исслед. – 2017. – Т. 5, № 4. – С. 42–54.

11. Suresh, R. Quantitation of spermatogenesis by DNA flow cytometry: comparative study among six species of mammals / R. Suresh, G. R. Aravindan, N. R. Moudgal // *J. Biosci.* – 1992. – Vol. 17, N 4. – P. 413–419. <https://doi.org/10.1007/BF02720096>
12. Влияние радиационного облучения на витаминный статус и сперматогенез крыс / В. В. Евдокимов [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 1997. – Т. 123, № 5. – С. 524–527.
13. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – 5th ed. – Geneva : WHO Press, 2010. – 271 p.
14. Evenson, D. P. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques / D. P. Evenson, K. L. Larson, L. K. Jost // *J. Androl.* – 2002. – Vol. 23, N 1. – P. 25–43. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>
15. Захидов, А. Ю. Биология стволовых клеток зародышевого пути / С. Т. Захидов, А. Ю. Кулибин, Т. Л. Маршак. – М. : МГУ, 2013. – 141 с.
16. Zareen, N. Testicular morphology: effects of mobile phone induced electromagnetic fields on mice testes / N. Zareen // *Profession. Med. J.* – 2009. – Vol. 16, N 2. – P. 289–292.
17. Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field / M. Saygin [et al.] // *Toxicol. Ind. Health.* – 2011. – Vol. 27, N 5. – P. 455–463. <https://doi.org/10.1177/0748233710389851>
18. Effects of exposure to electromagnetic field (1.8/0.9GHz) on testicular function and structure in growing rats / H. O Nisbet [et al.] // *Res. Veterinary Sci.* – 2012. – Vol. 93, N 2. – P. 1001–1005. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.10.023>
19. Effect of whole-body 1800 MHz GSM-like microwave exposure on testicular steroidogenesis and histology in mice / Z. Forgács [et al.] // *Reproduct. Toxicol.* – 2006. – Vol. 22, N 1. – P. 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.12.003>
20. Hinrikus, H. Understanding physical mechanism of low-level microwave radiation effect / H. Hinrikus, M. Bachmann, J. Lass // *Intern. J. Rad. Biol.* – 2018. – Vol. 94, N 10. – P. 877–882. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1478158>
21. Markov, M. Protect children from EMF / M. Markov, Y. Grigoriev // *Electromagn. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 34, N 3. – P. 251–256. <https://doi.org/10.3109/15368378.2015.1077339>

## References

1. Kudryashov Yu. B., Perov Yu. F., Rubin A. B. *Radiation biophysics: radio frequency and microwave electromagnetic radiation*. Moscow, Fizmatlit Publ., 2008. 181 p. (in Russian).
2. Grigor'ev Yu. G. From electromagnetic smog to electromagnetic chaos. to evaluating the hazards of mobile communication for health of the population. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost' = Medical Radiology and Radiation Safety*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 28–33 (in Russian).
3. Stozharov A. N. *Medical ecology: studies. Allowance*. Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 2007. 368 p. (in Russian).
4. Hardell L., Carlberg M., Söderqvist F., Mild K. H. Case-control study of the association between malignant brain tumours diagnosed between 2007 and 2009 and mobile and cordless phone use. *International Journal of Oncology*, 2013, vol. 43, no. 6, pp. 1833–1845. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2111>
5. IARC classifies radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans. *IARC Press Release*, 2011, no. 208. 6 p.
6. Wyde M., Cesta M., Blystone C., Elmore S., Foster P., Hooth M. [et al.] Report of partial findings from the national toxicology program carcinogenesis studies of cell phone radiofrequency radiation in Hsd: Sprague dawley® SD rats (whole body exposure). *BioRxiv*, 2018, 87 p. <https://doi.org/10.1101/055699>
7. Brody S. A. Male infertility and oxidative stress: the role of diet, lifestyle and nutritional supplements. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya [Andrology and genital surgery]*, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 33–41 (in Russian).
8. Vereshchako G. G. *Influence of electromagnetic radiation of mobile phones on the state of male reproductive system and offspring*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2015. 186 p. (in Russian).
9. Hamada A. J., Singh A., Agarwal A. Cell phones and their impact on male fertility: fact or fiction. *Open Reproductive Science Journal*, 2011, vol. 5, pp. 125–137. <https://doi.org/10.2174/1874255601103010125>
10. Khorseva N. I., Grigor'ev Yu. G., Grigor'ev P. E. The influence of low-intensity electromagnetic fields on the antenatal period of development of the organism. Part 1. From gametogenesis to childbirth (review). *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy [Journal of biomedical research]*, 2017, vol. 5, no. 4, pp. 42–54 (in Russian).
11. Suresh R., Aravindan G. R., Moudgal N. R. Quantitation of spermatogenesis by DNA flow cytometry: comparative study among six species of mammals. *Journal of Biosciences*, 1992, vol. 17, no. 4, pp. 413–419. <https://doi.org/10.1007/BF02720096>
12. Evdokimov V. V., Kodentsova V. M., Vrzhevskaya O. A., Erasova V. I., Yakushina L. M., Kirpatovskii V. I., Sakharov I. Yu. The impact of radiation exposure on vitamin status and spermatogenesis in rats. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny [Bulletin of experimental biology and medicine]*, 1997, vol. 123, no. 5, pp. 524–527 (in Russian).
13. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva, WHO Press, 2010. 271 p.
14. Evenson D. P., Larson K. L., Jost L. K. Sperm Chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, 2002, vol. 23, no. 1, pp. 25–43. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>
15. Zakhidov S. T., Kulibin A. Yu., Marshak T. L. *Embryonic stem cell biology*. Moscow, Moscow State University Publ., 2013. 141 p. (in Russian).

16. Zareen N. Testicular morphology: effects of mobile phone induced electromagnetic fields on mice testes. *Professional Medical Journal*, 2009, vol. 16, no. 2, pp. 289–292.

17. Saygin M., Caliskan S., Karahan N., Koyu A., Gumral N., Uguz A. Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field. *Toxicology and Industrial Health*, 2011, vol. 27, no. 5, pp. 455–463. <https://doi.org/10.1177/0748233710389851>

18. Nisbet H. O., Nisbet C., Akar A., Cevik M., Karayigit M. O. Effects of exposure to electromagnetic field (1.8/0.9GHz) on testicular function and structure in growing rats. *Research in Veterinary Science*, 2012, vol. 93, no. 2, pp. 1001–1005. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.10.023>

19. Forgács Z., Somosy Z., Kubinyi G., Bakos J., Hudák A., Surján A., Thuróczy G. Effect of whole-body 1800 MHz GSM-like microwave exposure on testicular steroidogenesis and histology in mice. *Reproductive Toxicology*, 2006, vol. 22, no. 1, pp. 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.12.003>

20. Hinrikus H. Bachmann M., Lass J. Understanding physical mechanism of low-level microwave radiation effect. *International Journal of Radiation Biology*, 2018, vol. 94, no. 10, pp. 877–882. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1478158>

21. Markov M., Grigoriev Y. Protect children from EMF. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2015, vol. 34, no. 3, pp. 251–256. <https://doi.org/10.3109/15368378.2015.1077339>

### Информация об авторах

*Чуешова Наталья Владимировна* – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: [natalya-chueshova@tut.by](mailto:natalya-chueshova@tut.by)

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

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

### Information about the authors

*Natalya V. Chueshova* – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: [natalya-chueshova@tut.by](mailto:natalya-chueshova@tut.by)

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

*Ihar A. Cheshyk* – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Director. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: [igor.cheshik@gmail.com](mailto:igor.cheshik@gmail.com)

**Р. Н. Ясюченя, С. Б. Кондрашова, Т. М. Лукашенко**

*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

### **ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕРДЦА, ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КРОВИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ В РАЦИОН ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК**

**Аннотация.** Исследованы биоэлектрическая активность сердца, про- и антиоксидантные процессы в крови взрослых крыс после введения в рацион пищевых добавок: глутамата и бензоата натрия, красителя тартразина. Потребление взрослыми крысами глутамата натрия, бензоата натрия, тартразина, каждого индивидуально, приводит к срыву частоты сердечных сокращений, уменьшению продолжительности электрической диастолы сердца, искажению потенциала *P*-зубца, увеличению показателей вариабельности сердечного ритма, что указывает на усиление активности холинергических нервных волокон, участвующих в регуляции сердечной деятельности. У половозрелых животных потребление глутамата натрия не влияет на состояние равновесия в системе перекисное окисление – антиоксидантная защита (АОЗ) в крови, тогда как краситель тартразин, длительно потребляемый с пищей, способствует инициации процесса перекисного окисления белков и вызывает угнетение АОЗ в крови половозрелых животных.

**Ключевые слова:** пищевые добавки, глутамат натрия, бензоат натрия, тартразин, сердце, перекисное окисление белков

**Для цитирования:** Ясюченя, Р. Н. Функциональное состояние сердца, перекисное окисление белков и активность антиоксидантных ферментов в крови половозрелых крыс при введении в рацион пищевых добавок / Р. Н. Ясюченя, С. Б. Кондрашова, Т. М. Лукашенко // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 226–233. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-226-233>

**R. N. Yasyuchenya, S. B. Kondrashova, T. M. Lukashenko**

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

### **FUNCTIONAL STATE OF THE HEART, PEROXIFICATION OXIDATION OF PROTEINS AND THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE BLOOD OF SEXUALLY MATURE RATS WHEN INTRODUCING FOOD SUPPLEMENTS**

**Abstract.** The bioelectric activity of the heart, pro- and antioxidant processes in the blood of adult rats after the introduction of dietary supplements: glutamate and sodium benzoate, dye tartrazine were investigated. Consumption of sodium glutamate, sodium benzoate, tartrazine, each individually, by adult rats leads to a breakdown in a heart rate, a decrease in the duration of electrical diastole of the heart, a distortion of the *P*-wave potential, an increase in heart rate variability, which indicates the increased activity of cholinergic nerve fibers involved in the regulation of the cardiac activity. In sexually mature animals, the consumption of sodium glutamate does not affect the equilibrium state in the peroxidation system – the antioxidant protection in the blood, while dye tartrazine, which is consumed with food for a long time, initiates the process of protein peroxidation and causes to suppress in the blood of sexually mature animals.

**Keywords:** food supplements, monosodium glutamate, sodium benzoate, tartrazine, heart, peroxidation of proteins

**For citation:** Yasyuchenya R. N., Kondrashova S. B., Lukashenko T. M. Functional state of the heart, peroxidation oxidation of proteins and the activity of antioxidant enzymes in the blood of sexually mature rats when introducing food supplements. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 226–233 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-226-233>

**Введение.** Патогенетическая функция активных метаболитов кислорода и органических свободных радикалов идентифицирована для многих заболеваний человека и в различной степени присуща патологии сердца [1]. В условиях недостаточной активности эндогенной антиоксидантной системы одним из наиболее эффективных способов защиты клеток от повреждающего действия окислителей является введение либо экзогенных веществ (прямые антиоксиданты), либо

лекарственных средств, способных активировать эндогенные противooksидительные механизмы (косвенные антиooksиданты) [2].

В настоящее время усилия исследователей направлены на поиск и разработку обладающих антиooksидительными свойствами средств, которые эффективны как для профилактики различных заболеваний, так и для их вспомогательной терапии [3, 4]. Однако набор официальных антиooksидантов в современной медицине остается довольно ограниченным и состоит в основном из однотипных препаратов на основе синтетических витаминов. Биологически активные добавки, широко представленные в торговой сети, как правило, недостаточно корректно исследованы предклинически и их свойства не соответствуют аннотированным в сопроводительной документации и рекламных проспектах. В связи с этим актуальными остаются исследования по выявлению различных направлений физиологического действия компонентов, входящих в состав продуктов питания, в комплексном эксперименте: доказать отсутствие их влияния на развитие патологических явлений в функционировании сердца и наличие антиooksидантных свойств.

В частности, указанное выше касается пищевых добавок, которые представляют собой субстраты, специально вносимые в продукты питания для достижения определенных технологических эффектов [5].

Самый известный усилитель вкуса – глутамат натрия (E621). Изучение способности глутамата натрия вызывать ожирение, диабет и поражение печени у животных дало неоднозначные результаты, и лишь в одном исследовании был выявлен его негативный эффект [6–8]. Тем не менее, дополнительного изучения требует использование высоких болюсных доз глутамата при нарушении функции гематоэнцефалического барьера.

Для сохранения товарного вида, пищевой ценности, срока хранения продуктов питания предназначены консерванты. Основным органическим химическим консервантом является бензойная кислота и ее натриевая соль (E211). Консервирующее действие бензоата натрия основано на его способности ингибировать активность находящихся в клетке ферментов, которые обеспечивают протекание окислительно-восстановительных реакций и тем самым уменьшают эффективность действия дрожжей и плесневых грибов [9].

Пищевой краситель желтого цвета тартразин (E102) широко используется в пищевой и фармацевтической промышленности. Однако при употреблении пищевых продуктов, напитков, лекарственных препаратов, кремов, окрашенных тартразином, нередко возникают побочные эффекты в виде бронхоспазма и мигрени, крапивницы и дерматита, нарушения зрения и ринит [10]. Являясь гаптеном, тартразин образует комплексы с белком, например с сывороточным альбумином, и становится полноценным антигеном, на который в организме вырабатываются антитела. При этом развиваются истинные аллергические реакции на тартразин [11].

Предельно допустимые суточные количества глутамата и бензоата натрия, а также красителя тартразина строго регламентируются законодательно для исключения их негативного влияния на здоровье населения [12]. Несмотря на это, при производстве пищевых продуктов (особенно кондитерского назначения, основными потребителями которых являются дети), может иметь место непреднамеренное превышение их допустимых доз.

Цель настоящего исследования – изучить влияние глутамата и бензоата натрия, красителя тартразина (при раздельном введении их в рацион питания) на функциональное состояние сердца и окислительно-восстановительные процессы в крови половозрелых крыс.

**Материалы и методы исследования.** Проведены 4 серии хронических исследований на самцах белых крыс линии Вистар ( $n = 40$ ) и 4 серии острых опытов ( $n = 104$ ). Возраст животных составлял 4,5 мес., масса тела –  $250 \pm 5,5$  г.

*Хронический эксперимент.* В хроническом эксперименте животные были разделены на 4 группы. На протяжении 30 сут животные каждой группы в дополнение к рациону получали раствор одной из пищевых добавок: 720 мг/кг глутамата натрия (мононатриевая соль L-глутаминовой кислоты, MSG; E 621, Sigma Chemical, США), 30 мг/кг бензоата натрия (E 211, «Пять океанов», Беларусь) и 45 мг/кг тартразина (E 102, ООО «РОХА ДАЙКЕМ», Россия). Максимально допустимые уровни данных пищевых добавок в продуктах питания установлены для человека в соответствии с едиными санитарно-эпидемиологическими и гигиеническими требованиями

к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) («Требования безопасности пищевых добавок и ароматизаторов», гл. II, раздел 22).

Согласно требованиям безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств (ТР ТС 029/2012 от 20 июля 2012 г. № 58), глутамат натрия, бензоат натрия и тартразин разрешены для применения при производстве пищевой продукции. Дозы добавок для крыс рассчитывали в соответствии с допустимыми суточными дозами для человека с использованием соответствующих формул и коэффициентов [13]. Контрольные крысы находились на стандартном рационе. Доступ к воде был не ограничен. После завершения хронического эксперимента все животные были взяты в острый опыт.

Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1), каталазы ( $H_2O_2:H_2O_2$ -оксидоредуктаза КФ 1.11.1.6) и спонтанную, металлкатализируемую модификацию белков определяли в сыворотке крови с помощью спектрофотометрического метода [14–16].

Измерение экстинкции анализируемых образцов осуществляли на ИФА-анализаторе Bio Tek EL x 808 (США).

В острых опытах проводили регистрацию электрокардиограммы (ЭКГ) [17]. Определяли следующие показатели: частоту сердечных сокращений (ЧСС); интервал  $P$ - $R$ ,  $R$ - $S$ ,  $S$ - $T$ , сегмент  $T$ - $P$ . Кроме того, измеряли амплитуду (в мкВ) зубцов  $P$ ,  $R$  и  $S$ ,  $T$ , а также вариабельность сердечного ритма (BCP). В литературе представлены сведения о том, что  $SDNN$ , мс (стандартное отклонение всех  $R$ - $R$ -интервалов) символизирует общий вклад адрено- и холинергических волокон в регуляцию сердечной деятельности [18]; квадратный корень суммы разностей последовательного ряда кардиоинтервалов ( $RMSDD$ , мс) свидетельствует о влиянии парасимпатического звена на сердце; коэффициент вариации полного массива кардиоинтервалов ( $CV$ , %) отражает суммарную активность вегетативного воздействия на ритм сердца;  $Mo$ , мс – наиболее вероятный для данного периода времени функциональный статус сердечно-сосудистой системы;  $AMo$ , % – доля кардиоинтервалов, соответствующая моде (показатель симпатических влияний на сердце);  $MxDMn$ , мс (вариационный размах) – разность между максимальным и минимальным значениями кардиоинтервалов [19].

Все экспериментальные работы выполнены с соблюдением правил биоэтики, утвержденным Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для лабораторных или иных целей.

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программы Statistica 6.0. Нормальность распределения показателей проверяли при помощи теста Шапиро–Уилка. Для межгруппового сравнения использовали  $t$ -критерий Стьюдента для независимых выборок или непараметрический тест Манна–Уитни. Результаты представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней ( $\bar{x}_{cp} \pm Sx_{cp}$ ). Критический уровень значимости ( $p$ ) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** Показано, что введение в рацион 4,5-месячным крысам пищевых добавок глутамата натрия, бензоата натрия, тартразина приводило к снижению ЧСС до  $351,5 \pm 17,5$ ;  $315,7 \pm 12,7$ ;  $301,0 \pm 9,7$  уд/мин соответственно ( $373,0 \pm 10,3$  уд/мин в контроле).

Установлены отличия в амплитудных характеристиках ЭКГ. Отмечено достоверное снижение амплитуды зубца  $P$ , что указывает на охват миокарда предсердий возбуждением. Выявлено увеличение потенциала  $S$ -зубца. Зубцы  $T$  и  $R$  статистически значимых альтераций не претерпевали. Измерение длительности интервалов и сегментов ЭКГ, отражающих процессы деполяризации предсердий ( $P$ - $R$ ) и желудочков ( $R$ - $S$ ), показало достоверный рост их значений ( $p < 0,05$ ). Однако процессы реполяризации ( $S$ - $T$ ) сердца были статистически снижены у животных, потреблявших бензоат натрия и тартразин.

Пищевая добавка глутамат натрия как компонент пищи взрослых особей после усвоения могла способствовать возрастанию  $MxDMn$  почти в 2 раза и усилению тонуса эфферентных волокон блуждающего нерва ( $MxDMn$ ) (см. таблицу). Вместе с тем в данной группе животных зафиксировано падение  $AMo$  на 37,97 %, свидетельствующее об ослаблении эффектов симпатического контура вегетативной регуляции работы сердца.

Анализ показателей, отражающих вагосимпатический баланс, выявил повышение ( $p < 0,05$ ) *SDNN* от  $11,31 \pm 0,05$  до  $2,47 \pm 0,17$  мс и снижение значения *CV* с  $1,64 \pm 0,04$  до  $0,10 \pm 0,11$  %. Следует отметить возрастание *RMSSD* от  $0,813 \pm 0,06$  до  $3,64 \pm 0,27$  мс, что свидетельствует об ослаблении нисходящих влияний блуждающего нерва на сердце ( $p < 0,05$ ) (см. таблицу).

**Изменение показателей ЭКГ и ВСП после введения в рацион половозрелых крыс глутамата натрия, бензоата натрия и тартразина**

**Changes in ECG and HRV indices after introducing glutamate sodium, sodium benzoate, and tartrazine into the diet of adult rats**

Показатель	Контроль ( $n = 10$ )	Животные, потреблявшие глутамат натрия ( $n = 10$ )	Животные, потреблявшие бензоат натрия ( $n = 10$ )	Животные, потреблявшие тартразин ( $n = 10$ )
<b>Показатели ЭКГ:</b>				
ЧСС, уд/мин	$373,0 \pm 10,3$	$351,5 \pm 17,5$	$315,7 \pm 12,7^*$	$301,0 \pm 9,7^*$
<i>P-R</i> , мс	$48,7 \pm 1,2$	$99,4 \pm 3,00^*$	$96,8 \pm 9,6^*$	$102,7 \pm 2,7^*$
<i>R-S</i> , мс	$11,2 \pm 0,3$	$21,00 \pm 0,3^*$	$19,6 \pm 0,2^*$	$19,8 \pm 0,4^*$
<i>S-T</i> , мс	$62,2 \pm 4,3$	$57,2 \pm 2,3$	$40,9 \pm 1,7^*$	$42,9 \pm 1,9^*$
<i>T-P</i> , мс	$39,6 \pm 4,6$	$151,6 \pm 15,3^*$	$205,2 \pm 14,5^*$	$206,3 \pm 12,4^*$
<i>P</i> , мкВ	$82,2 \pm 12,6$	$83,4 \pm 5,5$	$42,8 \pm 2,9^*$	$49,7 \pm 4,2^*$
<i>R</i> , мкВ	$492,7 \pm 97,5$	$283,7 \pm 3,2$	$234,0 \pm 5,8$	$227,3 \pm 11,2$
<i>S</i> , мкВ	$178,3 \pm 25,5$	$301,1 \pm 41,4^*$	$497,3 \pm 31,8^*$	$504,3 \pm 44,8^*$
<i>T</i> , мкВ	$76,2 \pm 19,8$	$151,6 \pm 5,2$	$205,2 \pm 49,1$	$206,3 \pm 23,5$
<b>Показатели ВСП:</b>				
<i>SDNN</i> , мс	$1,31 \pm 0,05$	$2,47 \pm 0,17^*$	$2,20 \pm 0,49$	$1,85 \pm 0,34$
<i>RMSSD</i> , мс	$0,813 \pm 0,06$	$3,64 \pm 0,27^*$	$1,58 \pm 0,32$	$1,57 \pm 0,23$
<i>CV</i> , %	$1,64 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,11^*$	$1,18 \pm 0,23$	$0,99 \pm 0,16$
<i>MxDMn</i> , мс	$8,02 \pm 0,42$	$13,63 \pm 1,17^*$	$9,96 \pm 1,62$	$11,37 \pm 2,89$
<i>Mo</i> , мс	$160,4 \pm 4,6$	$147,75 \pm 9,78$	$184,43 \pm 7,32^*$	$182,03 \pm 7,27^*$
<i>AMo</i> , %	$29,5 \pm 1,18$	$18,3 \pm 2,10^*$	$23,8 \pm 3,31$	$27,2 \pm 3,14$

Примечание. \* – статистически достоверное отличие в сравнении с показателями контрольной группы по критерию Манна–Уитни.

Анализ показателей ВСП показал, что у взрослых особей при употреблении бензоата натрия и тартразина статистически значимо увеличен *Mo*, что указывает на активизацию адренергических структур. В тех же условиях достоверных изменений в показателях *SDNN*, *CV*, *RMSSD*, *MxDMn*, *AMo* не наблюдали (см. таблицу).

Наряду с представленными выше показателями, полученными при исследовании функционального состояния сердца на фоне употребления взрослыми особями пищевых добавок, исследованы биохимические процессы в крови, отражающие особенности перекисного окисления белков (ПОБ) и антиоксидантной защиты (АОЗ) при тех же экспериментальных условиях. Обнаружено, что потребление глутамата натрия половозрелыми животными не влияло на содержание аминокислотных остатков, образованных в процессе ПОБ. Количество общих динитрофенилгидразонов (ОДГ), альдегидгидразонов (АДГ) и кетонгидразонов (КДГ) оставалось в пределах контрольных значений:  $0,372 \pm 0,054$  (контроль –  $0,286 \pm 0,032$ ),  $0,198 \pm 0,039$  (контроль –  $0,150 \pm 0,021$ ) и  $1,522 \pm 0,108$  (контроль –  $0,924 \pm 0,080$ ) ед. опт. пл. соответственно.

У взрослых животных после длительного употребления глутамата достоверных отличий активности СОД и каталазы от контроля не установлено (рис. 1, 2). Полученные результаты вполне согласуются с данными других авторов о том, что потребление глутамата натрия приводит к уменьшению токсической нагрузки на клетку, вызываемой воздействием супероксидного радикала [20].

При использовании в питании животных бензоата натрия концентрации ОДГ, АДГ и КДГ находились на уровне контрольных значений –  $0,422 \pm 0,089$ ;  $0,246 \pm 0,053$ ;  $1,379 \pm 0,116$  ед. опт. пл. соответственно (контроль –  $0,405 \pm 0,079$ ;  $0,242 \pm 0,053$ ;  $1,351 \pm 0,177$ ) (рис. 1). Установлен ингибирующий эффект на функциональную активность СОД – основного фермента АОЗ (рис. 1, 2). Это согласуется с результатами ряда исследований, в которых показано, что консервирующее

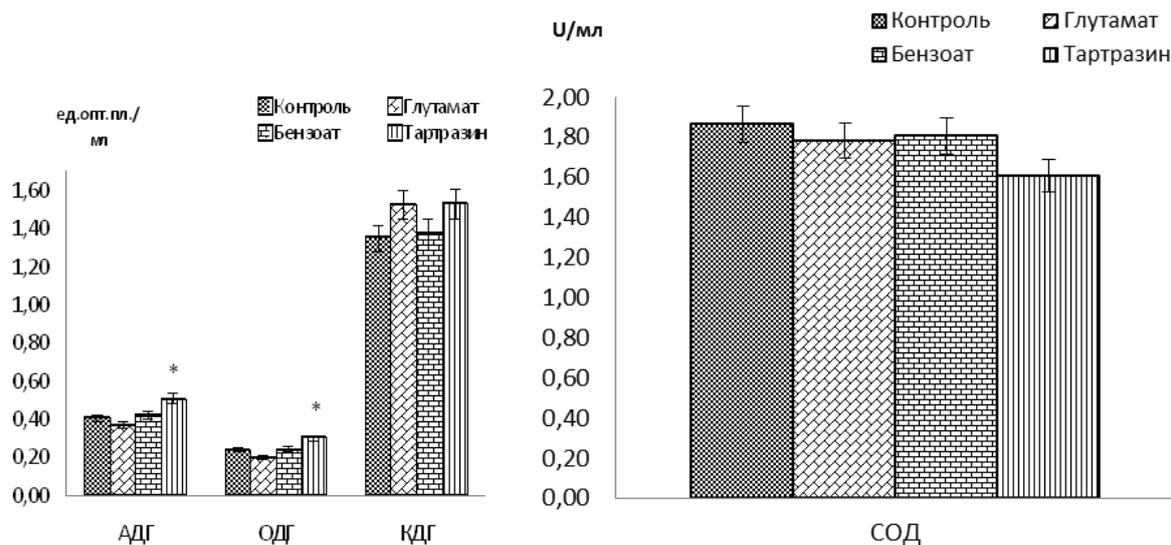


Рис. 1. Содержание продуктов перекисного окисления белков и СОД в сыворотке крови половозрелых крыс, получавших с рационом питания пищевые добавки. \* – различия достоверны при  $p < 0,05$

Fig. 1. The content of peroxidation products of proteins and SOD in the serum of sexually mature rats fed dietary supplements. \* – the differences are significant at  $p < 0.05$

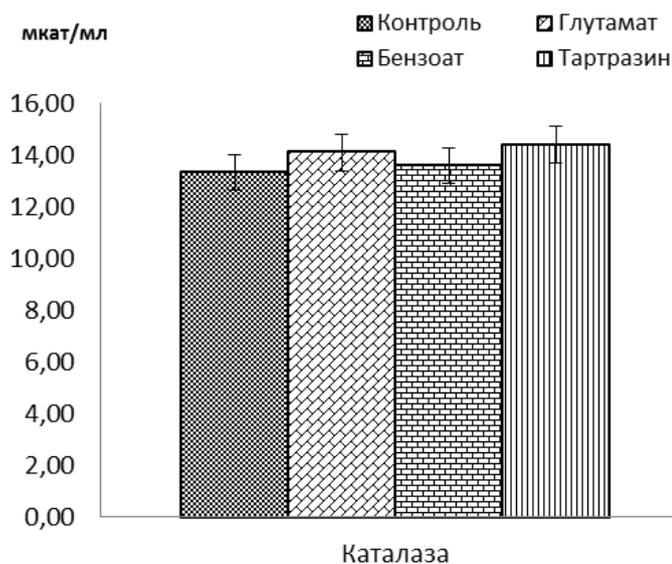


Рис. 2. Активность каталазы в сыворотке крови половозрелых крыс, получавших с рационом питания пищевые добавки. \* – различия достоверны при  $p < 0,05$

Fig. 2. The activity of catalase in the serum of sexually mature rats fed dietary supplements. \* – the differences are significant at  $p < 0.05$

действие бензоата натрия основано на его способности значительно снижать активность находящихся в клетке ферментов, которые обеспечивают протекание окислительно-восстановительных реакций [21].

Потребление половозрелыми крысами в качестве добавки пищевого красителя тартразина приводило к достоверному возрастанию количества продуктов ПОБ в крови: АДГ – на 24,96 %, ОДГ – на 25,61 % по отношению к контролю. В группе половозрелых животных зафиксирована тенденция к увеличению концентрации КДГ (на 13,39 %), а также к снижению активности СОД (на 14,74 %) и росту активности каталазы (на 7,88 %) (рис. 2). Некоторые авторы считают, что тартразин может выступать в качестве псевдоаллергена и индуцировать сдвиг баланса в сторону

преимущественного образования лейкотриенов, которые оказывают выраженное биологическое влияние на окислительные процессы и систему АОЗ [22].

**Заключение.** Потребление пищевых добавок глутамата натрия, бензоата натрия, тартразина крысами в возрасте 4,5 мес. в течение месяца привело к снижению частоты сердечных сокращений, уменьшению потенциала *P*-зубца, увеличению показателей variability сердечного ритма, что может являться следствием ускоренного вовлечения холинергической системы в регуляцию сердечной деятельности. На это указывает также снижение величины коэффициента *АМо*, свидетельствующее об ослаблении эффектов симпатического контура вегетативной регуляции работы сердца.

У половозрелых животных употребление в пищу глутамата натрия не затрагивает гомеостатическое равновесие перекисное окисление – антиоксидантная защита в крови. Бензоат натрия не оказывает влияния на перекисную модификацию белков и на уровень антиоксидантной защиты в организме, тогда как краситель тартразин усиливает процесс перекисного окисления белков и вызывает угнетение антиоксидантной активности в крови.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список использованных источников

1. Пасечник, И. Н. Механизмы повреждающего действия активированных форм кислорода на биологические структуры у больных в критических состояниях / И. Н. Пасечник // Вестн. интенсив. терапии. – 2001. – № 4. – С. 3–9.
2. Sayre, L. M. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease / L. M. Sayre, M. A. Smith, G. Perry // *Curr. Med. Chem.* – 2001. – Vol. 8, N 7. – P. 721–738. <https://doi.org/10.2174/0929867013372922>
3. Антиоксиданты в интенсивной терапии – теория и практика / Е. Р. Немцова [и др.] // Рос. мед. журн. – 2006. – № 4. – С. 18–22.
4. Новиков, В. Е. Стресспротекторные свойства синтетических и растительных антиоксидантов / В. Е. Новиков [и др.] // *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии.* – 2011. – № 9. – С. 40–43.
5. Сарафанова, Л. А. Применение пищевых добавок. Технические рекомендации / Л. А. Сарафанова. – СПб. : ГИОРД, 2005. – 193 с.
6. Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology / B. S. Meldrum // *J. Nutrition.* – 2000. – Vol. 130, N 4. – P. 1007S–1015S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1007S>
7. Farombi, E. O. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin / E. O. Farombi, O. O. Onyema // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2006. – Vol. 25, N 5. – P. 251–259. <https://doi.org/10.1191/0960327106ht621oa>
8. Monosodium glutamate and treadmill exercise: anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats / S. M. Vitor-de-Lima [et al.] // *Nutrition. Neurosci.* – 2017. – Nov. 10. – P. 1–9. <https://doi.org/10.1080/1028415x.2017.1398301>
9. Люк, Э. Консерванты в пищевой промышленности: свойства и применение / Э. Люк, М. Ягер ; пер. с нем. Л. А. Сарафановой ; науч. ред. М. Н. Пульцин. – СПб. : ГИОРД, 2000. – 255 с.
10. Amchova, P. Health safety issues of synthetic food colorants / P. Amchova, H. Kotlova, J. Ruda-Kucerova // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 73, N 3. – P. 914–922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
11. Еделев, Д. А. Международный опыт обеспечения безопасности и качества продуктов питания / Д. А. Еделев, В. М. Кантере, В. А. Матсон // *Пищевая промышленность.* – 2010. – № 12. – С. 70–71.
12. Хаитов, Р. М. Клиническая аллергология : рук. для практ. врачей / Р. М. Хаитов. – М. : МЕДпресс-информ, 2002. – 624 с.
13. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 2005. – 832 с.
14. Костюк, В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // *Вопр. мед. химии.* – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
15. Метод определения активности каталазы / М. А. Королук [и др.] // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–19.
16. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R. L. Levine [et al.] // *Meth. Enzymol.* – 1990. – Vol. 186. – P. 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)
17. Рощевская, И. М. Кардиоэлектрическое поле теплокровных животных и человека / И. М. Рощевская. – СПб. : Наука, 2008. – 250 с.
18. Михайлов, А. Н. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь / А. Н. Михайлов, В. Б. Римашевский // *Мед. новости.* – 2011. – № 8. – С. 6–10.
19. Фролов, А. В. Контроль механизмов адаптации сердечной деятельности в клинике и спорте / А. В. Фролов. – Минск : Полипринт, 2011. – 216 с.
20. Effect of vitamin E on monosodium glutamate induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats / O. O. Onyema [et al.] // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2006. – Vol. 43, N 1. – P. 20–24.

21. Благовещенская, Д. Б. Исследование токсических свойств распространенных современных консервантов / Д. Б. Благовещенская, А. С. Мерзляков // Вестн. новых мед. технологий. – 2011. – Т. 18, № 2. – С. 501–502.
22. Влияние гистамина на функциональные свойства нейтрофилов и интенсивность процесса пероксидного окисления нейтрофилов в крови доноров / А. Ю. Искусных [и др.] // Вестн. ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2008. – № 1. – С. 93–96.

## References

1. Pasechnik I. N. Mechanisms of the damaging effect of activated forms of oxygen on biological structures in patients in critical states. *Vestnik intensivnoi terapii* [Vestnik of intensive care], 2001, no. 4, pp. 3–9 (in Russian).
2. Sayre L. M., Smith M. A., Perry G. Chemistry of biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current Medicinal Chemistry*, 2001, vol. 8, no. 7, pp. 721–738. <https://doi.org/10.2174/0929867013372922>
3. Nemtsova E. R., Utkin M. M., Zvyagin A. A., Koryakov I. A., Chissov V. I., Zolotavkina Yu. B., Andreeva T. N., Batyrov F. A., Yakubovskaya R. I. Antioxidants in intensive care – theory and practice. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal* [Russian medical journal], 2006, no. 4, pp. 18–22 (in Russian).
4. Novikov V. E., Kryukova N. O., Krikova A. V., Leonov S. D. Stress-protective properties of synthetic and plant antioxidants. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii* [Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry], 2011, no. 9, pp. 40–43 (in Russian).
5. Sarafanova L. A. *The use of food additives. Technical recommendations*. St. Petersburg, GIORP Publ., 2005. 193 p. (in Russian).
6. Meldrum B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition*, 2000, vol. 130, no. 4, pp. 1007S–1015S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1007S>
7. Farombi E. O., Onyema O. O. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Human and Experimental Toxicology*, 2006, vol. 25, no. 5, pp. 251–259. <https://doi.org/10.1191/0960327106ht621oa>
8. Vitor-de-Lima S. M., Medeiros L. B., Benevides R. D. L., Dos Santos C. N., Lima da Silva N. O., Guedes R. C. A. Monosodium glutamate and treadmill exercise: anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats. *Nutritional Neuroscience*, 2017, Nov. 10, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1080/1028415x.2017.1398301>
9. Lück E., Jager M. *Chemische Lebensmittelkonservierung. 3rd ed.* Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag, 1995. 273 S. (Russ. ed.: Lyuk E., Yager M. *Preservatives in the food industry: properties and uses*. St. Petersburg, GIORP Publ., 2000. 256 p.).
10. Amchova P., Kotolova H., Ruda-Kucerova J. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2015, vol. 73, no. 3, pp. 914–922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
11. Edelev D. A., Kantere V. M., Matson V. A. International experience in ensuring the safety and quality of food. *Pishchevaya promyshlennost'* [Food industry], 2010, no. 12, p. 71 (in Russian).
12. Khaitov R. M. *Clinical allergology: a practice for practitioners*. Moscow, MEDpress-inform Publ., 2002. 624 p. (in Russian).
13. Khabriev R. U. (ed.). *Guide to the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. 2nd ed.* Moscow, Meditsina Publ., 2005. 832 p. (in Russian).
14. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Kovaleva Zh. V. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. *Voprosy meditsinskoi khimii* [Questions of medical chemistry], 1990, vol. 36, no. 2, pp. 88–91 (in Russian).
15. Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Maiorova I. G., Tokarev V. E. Method for the determination of catalase activity. *Laboratornoe delo* [Laboratory work], 1988, no. 1, pp. 16–19 (in Russian).
16. Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A.-G., Ahn B.-W., Shaltiel Sh., Stadtman E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 186, pp. 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)
17. Roshchevskaya I. M. *Cardioelectric field of warm-blooded animals and humans*. St. Petersburg, Nauka Publ., 2008. 250 p. (in Russian).
18. Mikhailov A. N., Rimashevskii V. B. Gastroesophageal reflux disease. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2011, no. 8, pp. 6–10 (in Russian).
19. Frolov A. V. *Control of mechanisms for the adaptation of cardiac activity in the clinic and sports*. Minsk, Poliprint Publ., 2011. 216 p. (in Russian).
20. Onyema O. O., Farombi E. O., Emerole G. O., Ukoha A. I., Onyeze G. O. Effect of vitamin E on monosodium glutamate induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2006, vol. 43, no. 1, pp. 20–24.
21. Blagoveshchenskaya D. B., Merzlyakov A. S. Study of the toxic properties of common modern preservatives. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii* [Bulletin of new medical technologies], 2011, vol. 18, no. 2, pp. 501–502 (in Russian).
22. Iskusnykh A. Yu., Basharina O. V., Artyukhov V. G., Alabovskii V. V. The effect of histamine on the functional properties of neutrophils and the intensity of the process of peroxidation of neutrophils in the blood of donors. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya* [Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy], 2008, no. 1, pp. 93–96 (in Russian).

### Информация об авторах

*Ясюченя Рита Николаевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rita\_yasuchenia@mail.ru

*Кондрашова Светлана Болеславовна* – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Svetlana.condraschova2011@yandex.ru

*Лукашенко Тамара Михайловна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: salovatm@mail.ru

### Information about the authors

*Rita N. Yasyuchenya* – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rita\_yasuchenia@mail.ru

*Svetlana B. Kondrashova* – Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Svetlana.condraschova2011@yandex.ru

*Tamara M. Lukashenko* – 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: salovatm@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)  
ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 576.54  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-234-243>

Поступила в редакцию 04.02.2019  
Received 04.02.2019

**Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## **ОЦЕНКА *IN VITRO* ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

**Аннотация.** Разработан комплексный метод оценки иммуномодулирующих свойств лекарственных средств, который включает оценку экспрессии молекул CD80, HLA-DR, CD32, CD205 и CD197, продукции интерлейкина-12, показателей жизнеспособности и апоптоза дендритными клетками; определение продукции реактивных форм кислорода и оценку фагоцитоза полинуклеарными фагоцитами; анализ экспрессии молекулы CD69, а также продукцию фактора некроза опухолей- $\alpha$  линией клеток Jurkat-tat; оценку экспрессии молекул CD80 и HLA-DR, показателей жизнеспособности и апоптоза линией клеток Daudi.

**Ключевые слова:** антигенпрезентирующие клетки, дендритные клетки, иммуномодулирующие лекарственные средства, клеточные линии, проточная цитометрия

**Для цитирования:** Дуж, Е. В. Оценка *in vitro* иммуномодулирующих свойств биологически активных веществ и лекарственных средств / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 234–243. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-234-243>

**A. V. Duzh, A. Y. Hancharou**

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

## **EVALUATION OF *IN VITRO* IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES AND DRUGS**

**Abstract.** A new combined method for screening of immunomodulatory properties of drugs was developed, including: expression of CD80, HLA-DR, CD32, CD205 and CD197, interleukin-12 production and apoptosis by DCs; production of reactive oxygen species and evaluation of phagocytosis by neutrophils; expression of CD69 and production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by Jurkat-tat cells; and CD80 and HLA-DR expression, viability and apoptosis using the Daudi cell line.

**Keywords:** antigen presenting cell, dendritic cells, immunomodulatory drugs, cell line, flow cytometry

**For citation:** Duzh A. V., Hancharou A. Y. Evaluation of *in vitro* immunomodulatory properties of biologically active substances and drugs. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biological navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 234–243 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-234-243>

**Введение.** В настоящее время на мировом фармацевтическом рынке представлено более 100 иммуномодулирующих лекарственных средств (ЛС), в том числе около 30 действующих веществ [1]. Регулярное появление новых ЛС, обладающих иммуномодулирующим действием, требует оценки их иммунобиологической активности на доклиническом этапе [2, 3].

На сегодняшний день описано и используется множество различных методов исследования иммунобиологической активности ЛС как *in vitro*, так и *in vivo*, среди которых можно отметить использование лабораторных животных (преимущественно мышей), клеток крови человека и животных [4]. Все существующие методы исследования, применяемые для тестирования иммуномодулирующих веществ, в частности с использованием экспериментальных животных или на первичных культурах клеток крови человека, достаточно трудоемки, занимают много времени при их выполнении и требуют большого числа образцов для обеспечения достоверности выводов [5]. Кроме того, отсутствует единый подход к тестированию иммуномодуляторов, в частности к выбору модели исследования, к корректности подбора концентрации, условий и длительности инкубации, определяемых показателей, а также к учету и статистической обра-

ботке результатов [6]. Все это послужило стимулом для разработки современного стандартизированного комплексного метода оценки иммуномодулирующей активности веществ ЛС.

Цель исследования – разработка комплексного метода тестирования лекарственных средств подгруппы иммуномодуляторов с преимущественным использованием клеточных линий человека для возможности применения его на этапах разработки, производства и контроля качества лекарственных средств.

**Материалы и методы исследования.** *Культивирование перевиваемых гемopoэтических клеточных линий.* Клеточные культуры Daudi (человек, лимфома Беркитта) и Jurkat-tat (человек, Т-лимфобластный лейкоз) выращивали на питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 %-ную термоинактивированную телячью эмбриональную сыворотку, L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина и пируват натрия.

*Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК) из венозной крови и получение ИНФ- $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток (ДК).* Мононуклеарные клетки из периферической крови доноров выделяли путем градиентного центрифугирования. Моноциты получали из фракции МПК методом адгезии. Для получения ИНФ- $\alpha$ -индуцированных ДК моноциты культивировали в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 %-ную телячью эмбриональную сыворотку и рекомбинантные человеческие цитокины (100 нг/мл ГМ-КСФ и 2000 ЕД/мл ИНФ- $\alpha$ ) при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в течение 4 сут для ускоренной дифференцировки ДК [7].

*Культивирование бактерий.* Лиофилизированные бактерии, выделенные из препарата Линекс, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Enterococcus faecium* культивировали в чашках Петри в плотных питательных средах для каждого вида бактерий: лактокоагар, бифидумагар, энтерокоагар. После культивирования выполняли инактивацию бактерий в этаноле [8]. В ряде экспериментов получали лизаты бактерий.

*Исследуемые вещества.* Для оценки иммуномодулирующей активности тестировали 11 зарегистрированных в Республике Беларусь ЛС (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Концентрации ЛС, использованных в исследовании

Table 1. Concentrations of drugs used in the study

Действующее вещество	Торговое наименование	Лекарственная форма	Концентрация 1	Концентрация 2
ЛС на основе лиофилизированного лизата бактерий	Бронхомунал П	Капсулы	0,07 мг/мл	0,7 мг/мл
ЛС на основе живых лиофилизированных бактерий	Линекс	Капсулы	0,28 мг/мл	28 мг/мл
Инозин пранобекс	Гроприносин	Таблетки	5 мг/мл	50 мг/мл
Умифеновир	Арбидол	Капсулы	1 мг/мл	10 мг/мл
Азоксимера бромид	Полиоксидоний	Лиофилизат	0,5 мкг/мл	5 мкг/мл
ЛС на основе экстракта тимуса крупного рогатого скота (КРС)	Тимолин	Лиофилизат	0,1 мг/мл	1 мг/мл
$\alpha$ -Глутамил-триптофан (натриевая соль)	Тимоген	Спрей назальный дозированный	0,25 мкг/мл	2,5 мкг/мл
Высокомолекулярное соединение на основе полифенола	Кагоцел	Таблетки	0,12 мг/мл	1,2 мг/мл
ЛС на основе рибосом и клеточных мембран возбудителей респираторных инфекций	Рибомунил	Гранулы	0,75 мкг/мл	75 мкг/мл
Глюкозаминилмурамилдипептид	Ликопид	Таблетки	10 мкг	100 мкг
Сок травы эхинацеи пурпурной ( <i>Echinacea purpurea</i> )	Иммунал	Раствор	2 мкл/мл	8 мкл/мл

*Приготовление растворов исследуемых лекарственных средств и веществ.* Концентрированные растворы исследуемых веществ готовили с учетом информации об их растворимости: на DPBS, этиловом спирте или ДМСО. Рабочие растворы готовили непосредственно перед исследованием и стерилизовали, используя шприцевые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм.

*Инкубация клеток с исследуемыми веществами.* Исследования проводили в 3–6-кратных повторях. Взвесь культуры ДК, клеток линии Daudi и Jurkat-tat разливали по лункам 6-луночного планшета. Готовили по 6 планшетов с каждой культурой. Концентрация клеток составила  $500 \pm 50$  тыс/мл. В лунки помещали следующие вещества: лунка 1 – отрицательный контроль (ОК) (100 мкл фосфатного буферного раствора); лунка 2 – положительный контроль (ПК) (ЛПС в конечной концентрации 1 мкг/мл для ДК и клеток линии Daudi, 12-миристат-13-ацетат (ФМА) в конечной концентрации 25 нг/мл – для клеток линии Jurkat-tat); лунки 3–4 – рабочие растворы исследуемого вещества (два разведения). Объем питательной среды с клетками и исследуемым веществом составлял 4 мл.

Планшеты с культурами клеток инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. ДК и клетки линии Daudi сокультивировали с исследуемыми веществами на протяжении 24 ч, Т-клетки – 6 ч, нейтрофилы периферической крови – 30 мин. Для последующего определения внутриклеточных цитокинов в лунки планшетов с ДК и клетками линии Jurkat-tat за 3 ч до окончания инкубации вносили монензин в концентрации 10 мкг/мл. По завершении времени культивирования культуры суспендировали в лунках, взвесь помещали в пробирки, отмывали дважды в DPBS и суспендировали в 1 мл DPBS.

*Определение поверхностных и внутриклеточных маркеров клеток.* Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике, используя моноклональные флуоресцентно меченные антитела [9].

*Определение мертвых клеток и клеток в состоянии апоптоза.* С целью выявления мертвых клеток использовали «витальный» интеркалирующий краситель – 7-аминоактиномицин Д, проникающий только через поврежденную клеточную мембрану, а для выявления находящихся в стадии апоптоза клеток – аннексин V, конъюгированный с FITC [10].

*Определение фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови.* В каждую лунку 24-луночного планшета вносили 100 мкл FITC-меченых бактерий ( $1 \cdot 10^9$ /мл) и 400 мкл гепаринизированной донорской крови. Взвесь инкубировали на протяжении 30 мин при +37 °С. После окончания инкубации разрушали эритроциты, для чего добавляли 2 мл лизирующего раствора и инкубировали пробирки на протяжении 15 мин в темноте. Клетки осаждали, ресуспендировали в 300–500 мкл DPBS и учитывали на проточном цитометре [11].

*Определение продукции свободных радикалов кислорода нейтрофилами периферической крови.* Детекцию реактивных форм кислорода (reactive oxygen species – ROS) осуществляли с использованием дигидрородамина (DHR123). Для детекции ROS в 1,5 мл гепаринизированной периферической крови вносили DHR123 в концентрации 10 мкМ и доводили объем взвеси питательной средой до 3,0 мл. Взвесь инкубировали в термостате при температуре 37 °С на протяжении 10 мин. В пробирки для цитофлуориметра помещали рабочие растворы исследуемого вещества и контролей: лунка 1 – ОК (100 мкл фосфатного буферного раствора); лунка 2 – ПК (ФМА в конечной концентрации 25 нг/мл); лунки 3–5 – рабочие растворы исследуемого вещества (два разведения).

В каждую пробирку вносили по 200 мкл взвеси крови с DHR123 и инкубировали пробирки в термостате при температуре 37 °С на протяжении 30 мин. После окончания инкубации разрушали эритроциты, для чего добавляли 2 мл лизирующего раствора и инкубировали пробирки на протяжении 10 мин в темноте. Клетки осаждали, ресуспендировали в 300 мкл DPBS и учитывали на проточном цитометре [12].

*Статистический анализ.* Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Statistica (версия 10–12 StatSoft, США) и StatPlus 4.9 (AnalystSoft, США). Полученные показатели представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25-го и 75-го процентилей. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости  $p < 0,05$  [13].

**Результаты и их обсуждение.** *Оценка влияния иммуномодулирующих лекарственных средств на антигенпредставляющие клетки.* Изучен широкий спектр молекул, которые могут служить маркерами активации ДК при доклиническом исследовании иммуномодулирующих свойств ЛС: экспрессия маркеров антигенпредставления и костимуляции: CD80 и HLA-DR;

экспрессия молекул CD32 и CD205, характеризующих интернализацию комплексов антиген–антитело, маннозиллированных или фукозиллированных антигенов;  
экспрессия маркера миграционной способности ДК – CD197 (CCR7);  
внутриклеточная продукция ИЛ-12.

Жизнеспособность ДК, которая оценивалась при помощи интеркалирующего красителя 7-AAD, составила более 90 % (табл. 2). Доля клеток в состоянии апоптоза не превышала более 5,6 %.

Установлено, что ЛС № 1 и № 2 на основе лиофилизированных бактерий и ЛС № 9 на основе рибосом и клеточных мембран возбудителей респираторных инфекций достоверно увеличивали экспрессию молекул CD80 ДК (более чем в 2 раза) по сравнению с ОК, при этом экспрессия этой же молекулы при сокультивировании с другими ЛС существенно не отличалась от ОК.

Полученные результаты анализа экспрессии CD197, которая указывает на миграционную способность клеток, не выявили отличий при сокультивировании ДК с ЛПС и другими тестируемыми иммуномодуляторами. Но при этом ЛС № 4 (умифеновир) в концентрациях 50 и 150 мкг/мл достоверно уменьшал содержание CD197<sup>+</sup> ДК в культуре ( $p = 0,016$  и  $p = 0,009$  соответственно).

Исследована внутриклеточная продукция ИЛ-12, который продуцируется активированными ДК (табл. 2). Продукция ИЛ-12 без стимуляции ДК в ОК составила 1,2 (0,9–1,8) %, в ПК – 19,2 (17,5–25,1) %. Использование ЛС № 1, 2 и 9 на основе бактерий и их компонентов привело к увеличению числа продуцирующих ИЛ-12 ДК до 20 %. При сокультивировании ДК с ЛС № 3 (инозин пранобексом) продукция ИЛ-12 в обеих концентрациях увеличилась на 4,9 (3,8–5,9) и 5,6 (4,3–7,8) % соответственно по сравнению с ОК.

Т а б л и ц а 2. Показатели апоптоза, жизнеспособности, экспрессия молекулы CD197, ИЛ-12 дендритными клетками при сокультивировании с ЛС

Table 2. Indicators of apoptosis, viability, CD197, IL-12 expression by DCs during drug cocultivation

Вещество	Жизнеспособность ДК, %		Содержание ДК в состоянии апоптоза, %		CD197, %		ИЛ-12, %	
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	93,4 (91,9–93,9)		4,7 (3,7–5,5)		30,1 (29,6–31,3)		1,2 (0,9–1,8)	
ПК	93,4 (92,0–94,0)		4,4 (4,2–4,8)		30,0 (27,5–33,8)		19,2 (17,5–25,1)	
ЛС № 1	92,5 (92,1–96,1)	93,1 (92,5–95,5)	1,5 (1,4–2,0)	3,2 (3,0–3,2)	29,6 (22,9–30,0)	28,1 (27,9–29,0)	18,9 (18,6–21,2)	20,3 (16,9–22,3)
ЛС № 2	93,4 (92,6–94,2)	93,9 (92,0–94,6)	3,0 (2,6–3,3)	2,7 (2,6–3,4)	33,3 (32,0–33,4)	32,0 (31,3–35,0)	16,2 (15,6–17,2)	20,3 (19,2–26,5)
ЛС № 3	92,4 (91,0–94,4)	92,6 (92,5–93,5)	3,9 (2,8–4,8)	4,1 (2,7–4,2)	28,8 (26,9–32,5)	30,4 (30,4–33,3)	4,9 (3,8–5,9)	5,6 (4,3–7,8)
ЛС № 4	90,6 (89,8–92,0)	93,9 (91,3–94,1)	1,9 (1,9–3,7)	3,7 (2,9–3,8)	18,9 (14,0–20,1)	12,3 (10,6–18,4)	1,4 (1,4–2,0)	0,8 (0,6–1,5)
ЛС № 5	94,2 (92,0–94,2)	92,6 (92,1–94,8)	2,1 (1,4–2,1)	5,6 (3,9–5,6)	32,0 (31,2–32,7)	34,4 (32,2–35,5)	1,6 (1,5–2,3)	1,5 (0,5–1,6)
ЛС № 6	94,2 (88,6–99,6)	93,4 (89,0–96,1)	3,3 (2,0–4,5)	4,1 (2,6–4,9)	35,0 (33,2–48,6)	30,2 (25,0–40,4)	0,8 (0,1–1,2)	0,9 (0,0–1,5)
ЛС № 7	91,7 (88,9–94,3)	92,4 (90,1–94,7)	2,7 (2,1–3,2)	4,5 (2,8–4,7)	20,3 (19,3–22,1)	25,1 (24,1–26,3)	2,3 (1,9–2,5)	2,4 (2,1–2,8)
ЛС № 8	92,6 (86,3–94,2)	95,1 (93,1–98,3)	1,7 (2,2–3,5)	2,6 (1,9–2,8)	25,7 (24,2–27,5)	31,2 (30,2–31,5)	2,5 (2,4–2,8)	2,7 (2,3–2,8)
ЛС № 9	93,5 (91,5–97,2)	94,6 (89,9–99,1)	3,1 (2,5–3,2)	5,1 (3,3–5,4)	31,4 (30,1–33,2)	32,6 (31,2–33,5)	15,7 (15,1–16,3)	20,9 (19,3–23,1)
ЛС № 10	91,4 (88,2–94,1)	92,9 (89,6–94,5)	4,7 (4,1–6,0)	5,7 (4,8–5,9)	33,1 (31,8–36,7)	34,5 (32,2–35,6)	1,9 (1,6–1,9)	2,4 (1,9–2,5)
ЛС № 11	92,6 (91,3–93,8)	93,7 (90,2–95,6)	2,6 (2,1–3,7)	4,2 (3,7–4,6)	27,6 (24,3–29,3)	29,5 (28,2–31,5)	0,9 (0,6–0,9)	1,3 (0,9–1,4)

Усиление экспрессии молекулы CD32 проявлялось лишь в ПК, а также на ДК, которые со-культивировали с ЛС на основе микроорганизмов или их компонентов. В ЛС синтетического происхождения в содержании CD32<sup>+</sup> ДК видимых изменений не обнаружено.

Выявлена высокая концентрация молекул CD205 при стимуляции ДК с ЛПС – 178,2 (150,4–190,2) % (табл. 3), при этом ОК составил 90,7 (80,0–94,0) %. ЛС № 1 в высокой концентрации ( $p = 0,01$ ), ЛС № 2 ( $p = 0,016$ ) и ЛС № 9 в обеих концентрациях ( $p = 0,012$ ) обуславливали усиление экспрессии данного рецептора на ДК. Инкубированные с инозин пранобексом в высокой концентрации ДК также отличались более высокими значениями экспрессии CD205 в сравнении с ОК ( $p = 0,028$ ).

При культивировании ДК с ЛПС в качестве ПК экспрессия HLA-DR в клетках увеличивалась в 2 раза. Добавление ЛС № 1 на основе лизата бактерий, ЛС № 2 на основе живых бактерий и ЛС № 9 на основе рибосом и клеточных мембран возбудителей респираторных инфекций также достоверно усиливало экспрессию маркера HLA-DR на поверхности ДК ( $p < 0,05$ ). ЛС № 3 в меньшей концентрации (5 мкг/мл) не оказывало существенного влияния на экспрессию HLA-DR ( $p = 0,602$ ), а в концентрации 50 мкг/мл усиливало экспрессию этой молекулы ( $p = 0,106$ ).

Т а б л и ц а 3. Экспрессия молекул CD80, HLA-DR CD32 и CD205 с ДК при сокультивировании с ЛС

Table 3. Expression of CD80, HLA-DR CD32, and CD205 molecules with DK during drug cocultivation

Вещество	CD80 <sup>+</sup> , %		HLA-DR, усл. ед.		CD32, %		CD205, усл. ед.	
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	11,0 (8,0–14,0)		168,0 (156,0–197,0)		19,5 (17,5–20,3)		90,7 (80,0–94,0)	
ПК	65,0 (65,0–75,0)		320,0 (310,0–350,0)		65,8 (55,9–66,3)		178,2 (150,4–190,2)	
ЛС № 1	26,0 (21,0–32,0)	36,7 (35,2–39,6)	275,2 (275,2–285,0)	332,3 (331,1–335,4)	30,6 (27,5–32,1)	48,3 (45,6–51,5)	99,8 (90,6–100,2)	120,5 (112,2–128,9)
ЛС № 2	33,0 (29,0–36,0)	36,0 (28,5–42,1)	243,5 (242,4–247,8)	294,0 (281,9–303,2)	37,5 (32,6–38,9)	55,6 (47,0–59,8)	125,6 (117,5–135,6)	164,0 (150,8–165,0)
ЛС № 3	10,0 (9,0–11,0)	7,6 (3,4–10,4)	184,6 (169,0–210,0)	208,8 (208,5–209,5)	19,2 (17,8–20,0)	21,5 (20,2–24,5)	100,1 (95,6–105,6)	112,3 (105,6–115,6)
ЛС № 4	11,0 (10,0–12,0)	10,2 (6,2–10,9)	172,3 (169,7–176,4)	178,7 (173,6–184,1)	16,8 (14,3–21,4)	19,8 (18,9–22,9)	88,2 (86,7–96,6)	89,8 (82,2–94,9)
ЛС № 5	6,2 (5,6–11,8)	9,0 (6,5–9,8)	166,5 (157,5–172,7)	188,8 (180,4–189,3)	17,6 (17,1–22,1)	19,0 (18,6–21,9)	90,5 (89,3–95,8)	86,8 (85,0–86,9)
ЛС № 6	7,7 (5,3–11,0)	8,2 (6,2–11,6)	119,2 (118,2–137,5)	115,1 (108,0–125,0)	19,2 (17,5–23,5)	20,0 (16,4–28,9)	82,7 (79,0–86,0)	84,5 (73,2–90,4)
ЛС № 7	8,3 (7,6–7,9)	7,3 (6,9–7,4)	137,2 (135,2–139,4)	134,5 (132,2–145,3)	18,3 (16,3–21,7)	19,6 (18,3–21,2)	83,4 (79,6–86,3)	88,2 (83,2–91,5)
ЛС № 8	5,1 (4,9–5,7)	6,2 (5,6–7,1)	154,1 (151,5–165,3)	155,6 (151,2–165,3)	17,5 (15,9–18,3)	17,5 (16,3–18,9)	87,4 (84,5–88,6)	89,5 (86,5–92,6)
ЛС № 9	32 (29,3–32,8)	37 (35,6–37,5)	265,0 (249,6–279,3)	297,0 (269,3–307,5)	38,5 (37,3–42,6)	48,4 (45,6–51,9)	132,8 (126,3–143,2)	158,7 (144,3–165,3)
ЛС № 10	9,7 (9,6–10,6)	9,8 (9,5–10,2)	142,6 (138,5–151,8)	144,2 (132,5–154,2)	16,3 (15,6–18,5)	17,3 (16,5–19,7)	87,3 (85,7–88,6)	90,3 (86,3–93,5)
ЛС № 11	7,4 (6,8–7,7)	6,5 (6,2–7,1)	123,8 (121,6–126,4)	119,7 (114,3–132,7)	18,6 (17,5–21,3)	19,4 (18,6–21,3)	78,3 (75,3–81,6)	79,3 (74,3–83,2)

*Оценка функциональной активности нейтрофилов крови.* Под действием исследуемых ЛС с иммуномодулирующей активностью определяли интенсивность фагоцитоза и продукцию ими свободных радикалов кислорода.

Интенсивность фагоцитоза при воздействии ЛС на основе бактерий (№ 1, № 2) и ЛС № 9 на основе рибосом и клеточных мембран усиливалась в сравнении с ОК ( $p < 0,01$ ), при этом активность ЛС на основе лиофилизированного лизата бактерий была сравнима с ЛПС, а эффект ЛС на основе живых лиофилизированных бактерий был несколько слабее ( $p = 0,004$ ). При тестировании

остальных ЛС разного происхождения и концентраций не наблюдалось существенных различий в интенсивности фагоцитоза ( $p > 0,05$ ).

Оценка с помощью флуоресцирующего зонда DHR123 продукции свободных радикалов кислорода (табл. 4) показала, что доля нейтрофилов, продуцирующих свободные радикалы кислорода без стимуляции, составила 5,0 (3,0–5,0) %. У ЛС на основе бактерий и их компонентов (№ 1, 2, 9) выявлена способность к стимуляции респираторного взрыва (>80 %) ( $p < 0,03$ ), сравнимая с ПК. Установлена корреляция между разностью концентраций ЛС № 1 и их способностью стимулировать кислородный взрыв ( $p = 0,012$ ). Статистически достоверных различий в продукции свободных радикалов кислорода при воздействии на нейтрофилы остальных ЛС не выявлено ( $p < 0,01$ ).

Т а б л и ц а 4. Результаты оценки интенсивности фагоцитоза флуоресцентно меченных бактерий нейтрофилами и продукции свободных радикалов кислорода нейтрофилами при сокультивировании с ЛС

Table 4. Results of evaluation of the phagocytosis intensity of fluorescently marked bacteria by neutrophils and assessment of the production of the reactive oxygen species by neutrophils during drug cocultivation

Вещество	Интенсивность фагоцитоза, усл.ед.		$p$ (в сравнении с ОК)	Продукция свободных радикалов кислорода, %		$p$ (в сравнении с ОК)
	Концентрация 1	Концентрация 2		Концентрация 1	Концентрация 2	
ОК	406,7 (406,3–450,5)			5,0 (3,0–5,0)		
ПК	543,6 (531,6–564,7)			98,0 (97,0–98,0)		
ЛС № 1	524,4 (509,3–555,5)	540,3 (537,4–544,3)	0,001	80,0 (80,0–82,0)	92,0 (89,0–92,0)	0,012
ЛС № 2	472,0 (451,9–506,9)	509,6 (505,3–513,9)	0,004	92,0 (88,0–93,0)	93,0 (93,0–94,0)	0,023
ЛС № 3	399,0 (370,0–470,8)	398,4 (392,5–402,0)	0,561	6,6 (5,9–7,4)	5,0 (4,1–6,1)	0,598
ЛС № 4	391,7 (350,8–414,0)	382,4 (378,4–390,9)	0,856	2,2 (0,4–4,1)	4,9 (4,0–5,2)	0,752
ЛС № 5	410,5 (390,0–437,0)	397,2 (390,3–402,3)	0,658	6,6 (5,0–8,4)	6,1 (6,0–6,8)	0,635
ЛС № 6	385,2 (372,3–424,9)	391,0 (381,2–400,5)	0,519	5,7 (4,6–6,9)	5,1 (4,5–5,6)	0,896
ЛС № 7	405,2 (392,7–460,4)	389,0 (387,6–404,4)	0,596	6,2 (5,2–6,7)	5,5 (5,1–5,9)	0,623
ЛС № 8	398,1 (386,2–406,2)	401,3 (386,3–412,6)	0,659	3,7 (3,5–3,9)	3,4 (3,1–3,8)	0,541
ЛС № 9	501,8 (491,2–510,5)	495,6 (486,3–507,3)	0,001	91,0 (87,0–94,3)	92,6 (89,5–94,6)	0,019
ЛС № 10	395,3 (386,2–409,7)	389,6 (376,8–401,2)	0,789	6,5 (6,1–7,6)	5,9 (5,1–6,8)	0,865
ЛС № 11	387,2 (365,8–395,3)	388,2 (378,2–395,6)	0,753	4,7(4,1–5,2)	4,6 (4,1–5,5)	0,449

Оценка функциональной активности Т-клеток. Клетки линии Jurkat-tat сокультивировали с ЛС в двух разных концентрациях на протяжении 6 ч. В качестве ПК использовали ФМА. Активацию Т-клеток определяли с помощью классического маркера CD69. Оценивали также продукцию ФНО- $\alpha$  клетками в ответ на стимуляцию ЛС (табл. 5).

Согласно результатам исследования, ФМА вызывал активацию более 75 % клеток линии Jurkat-tat ( $p = 0,012$ ), а ЛС № 1 в высокой концентрации, ЛС № 2 в обеих концентрациях и ЛС № 9 – усиление экспрессии молекулы CD69<sup>+</sup> клетками ( $p < 0,01$ ). Инкубация с ЛС № 3–11, в том числе с тималином и тимогеном, не привела к увеличению числа CD69<sup>+</sup> клеток линии Jurkat-tat (табл. 5).

Установлено, что ФМА вызывал усиление продукции ФНО- $\alpha$  более чем у 25 % клеток линии Jurkat-tat ( $p = 0,012$ ). ЛС № 1, № 2 и ЛС № 9 в обеих концентрациях также способствовали усилению продукции этой молекулы клетками ( $p < 0,01$ ).

Оценка функциональной активности В-клеток. В экспериментах для оценки влияния ЛС на функциональную активность В-клеток была использована клеточная линия Daudi. С учетом того, что спектр поверхностных молекул ДК и В-клеток в целом схож, для оценки функции В-клеток в ответ на стимуляцию ЛС успешно использовали два маркера для оценки функции антигенпрезентирующих клеток (АПК): CD80 и HLA-DR.

Показано, что ЛПС и ЛС № 1, 2 и 9 достоверно усиливали экспрессию маркера CD80 клетками линии Daudi ( $p < 0,05$ ) (табл. 6).

Установлено, что ЛПС, ЛС на основе бактерий и инозин пранобекс как в низкой ( $p = 0,03$ ), так и в высокой ( $p = 0,009$ ) концентрации усиливали экспрессию молекулы HLA-DR клетками линии Daudi (табл. 6).

Т а б л и ц а 5. Экспрессия молекул CD69, ФНО- $\alpha$  Т-клетками при сокультивировании с ЛСTable 5. Expression of CD69, TNF- $\alpha$  molecules with T-cells during drug cocultivation

Вещество	CD69*, %		$p$ (с ОК)	ФНО- $\alpha^*$ , %		$p$ (с ОК)
	Концентрация 1	Концентрация 2		Концентрация 1	Концентрация 2	
ОК	15,0 (14,0–15,0)			3,6 (3,4–4,5)		
ПК	76,0 (75,0–79,0)			26,6 (22,5–29,7)		
ЛС № 1	28,0 (24,0–29,0)	40,0 (35,0–41,0)	0,001	7,5 (6,9–8,3)	8,5 (7,6–8,8)	0,002
ЛС № 2	18,0 (15,0–20,0)	26,0 (25,0–27,0)	0,003	7,6 (7,5–8,6)	11,2 (10,6–11,5)	0,003
ЛС № 3	13,0 (13,0–14,0)	17,5 (16,5–18,9)	0,912	2,2 (1,2–3,2)	1,1 (0,7–2,1)	0,856
ЛС № 4	12,0 (6,9–14,0)	13,8 (13,1–14,5)	0,661	1,1 (0,9–1,4)	0,7 (0,6–1,2)	0,789
ЛС № 5	12,5 (10,0–14,0)	15,3 (13,2–16,4)	0,552	1,2 (0,8–1,2)	2,2 (2,2–2,2)	0,659
ЛС № 6	12,5 (10,6–13,0)	12,8 (12,0–12,8)	0,526	3,6 (2,5–3,6)	1,9 (1,9–2,5)	0,596
ЛС № 7	12,3 (11,2–15,0)	13,1 (11,7–14,9)	0,756	4,5 (3,5–5,4)	4,1 (3,5–4,5)	0,658
ЛС № 8	11,9 (9,6–12,2)	12,3 (11,6–13,2)	0,936	3,1 (2,8–3,5)	3,2 (2,8–3,6)	0,753
ЛС № 9	30,2 (28,6–31,2)	36,5 (34,2–37,9)	0,006	8,0 (7,6–8,5)	10,3 (10,1–11,5)	0,004
ЛС № 10	12,6 (11,5–13,6)	12,7 (11,9–13,2)	0,589	2,7 (2,2–2,9)	2,8 (2,4–2,9)	0,756
ЛС № 11	13,2 (12,5–14,6)	13,8 (12,6–14,1)	0,741	4,1 (3,8–4,3)	3,8 (3,5–3,9)	0,958

Т а б л и ц а 6. Экспрессия молекул CD80, HLA-DR В-клетками при сокультивировании с ЛС

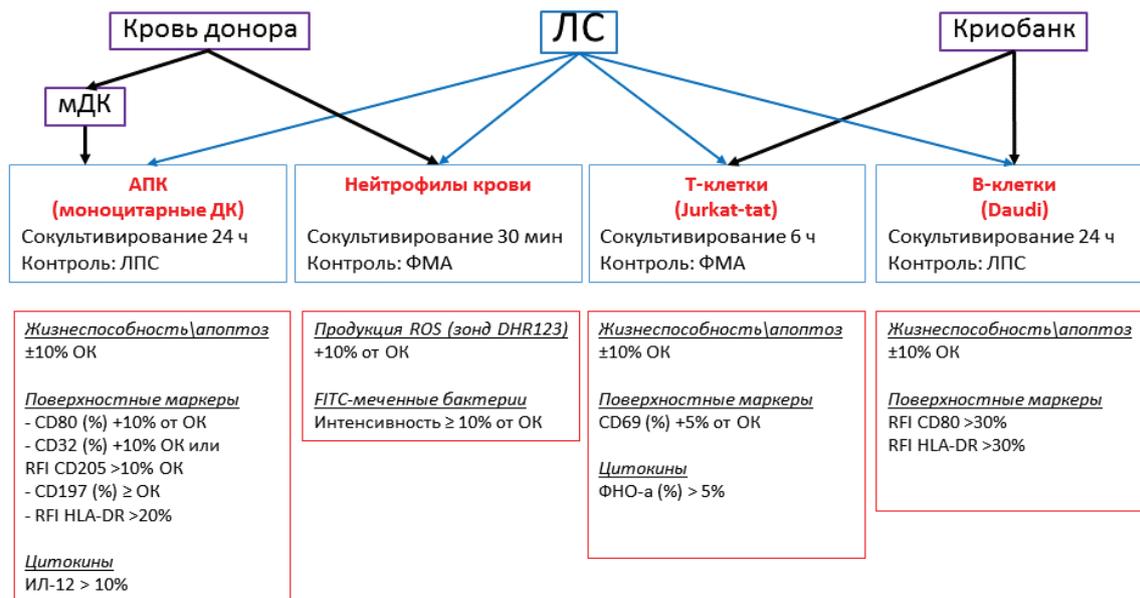
Table 6. Expression of CD80, HLA-DR molecules with B-cells during drug cocultivation

Вещество	CD80, усл. ед.		HLA-DR, усл. ед.	
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	40,0 (38,0–45,0)		141,0 (139,0–149,0)	
ПК	68,0 (65,8–80,7)		220,0 (214,0–222,0)	
ЛС № 1	79,1 (73,5–86,5)	81,4 (80,2–86,0)	192,0 (191,0–200,0)	199,8 (199,6–202,1)
ЛС № 2	61,2 (59,7–63,2)	69,2 (65,8–72,1)	183,0 (174,0–191,0)	197,6 (196,4–197,6)
ЛС № 3	45,8 (44,4–48,2)	40,8 (38,3–42,0)	166,0 (155,0–167,0)	171,0 (169,7–176,1)
ЛС № 4	36,9 (29,9–37,3)	37,5 (35,9–37,9)	126,9 (121,7–138,4)	143,4 (142,0–144,1)
ЛС № 5	40,4 (37,9–41,9)	38,9 (35,0–42,2)	130,8 (125,7–133,9)	140,9 (140,3–142,9)
ЛС № 6	39,8 (32,4–42,4)	40,9 (35,8–42,8)	145,9 (131,9–147,6)	145,0 (144,3–147,3)
ЛС № 7	36,2 (31,8–39,2)	41,1 (40,1–46,9)	132,5 (128,9–137,2)	144,4 (139,1–147,1)
ЛС № 8	34,6 (32,6–38,2)	39,8 (36,5–41,2)	141,6 (135,2–143,7)	153,2 (146,2–159,3)
ЛС № 9	70,2 (68,2–72,6)	77,3 (74,3–81,2)	190,3 (181,3–198,2)	200,6 (195,3–201,3)
ЛС № 10	34,2 (32,5–37,5)	36,1 (35,2–39,4)	161,4 (154,3–168,5)	159,6 (154,8–165,5)
ЛС № 11	35,3 (33,2–37,9)	35,2 (32,5–37,9)	138,5 (135,6–142,3)	140,2 (135,6–141,2)

В результате проведенных нами исследований был разработан комплексный метод оценки *in vitro* биологической активности иммуномодулирующих ЛС, включающий сокультивирование исследуемых веществ с ДК, нейтрофилами, клетками линий Daudi и Jurkat-tat и последующую оценку экспрессии ряда поверхностных и внутриклеточных молекул, фагоцитарной активности и продукции свободных радикалов кислорода (см. рисунок).

Разработанный комплексный метод оценки *in vitro* иммуномодулирующих свойств ЛС включает наиболее информативные показатели, пригодные для рутинного тестирования:

1) оценку экспрессии молекул CD80, HLA-DR, CD32, CD205 и CD197, продукции интерлейкина-12, показателей жизнеспособности и апоптоза дендритными клетками;



Алгоритм исследования иммуномодулирующих свойств ЛС  
Algorithm of the research of immunomodulatory properties of drugs

2) определение продукции реактивных форм кислорода и оценку фагоцитоза нейтрофилами периферической крови;

3) анализ экспрессии молекулы CD69, а также продукцию фактора некроза опухолей-α линией клеток Jurkat-tat;

4) оценку экспрессии молекул CD80 и HLA-DR линией клеток Daudi.

На основании проведенных исследований нами предложены критерии для определения иммунобиологической активности ЛС.

*Условия, при которых исследуемое вещество может рассматриваться как активирующее АПК:*

увеличение числа ДК, экспрессирующих молекулы CD32 и CD80 на 10 % и более в сравнении с ОК;

усиление интенсивности экспрессии молекулы HLA-DR на 20 % и более в сравнении с ОК;

усиление интенсивности экспрессии молекулы CD205 на 10 % и более в сравнении с ОК;

число ДК в стадии апоптоза/некроза не отличается более чем на 10 % в сравнении с ОК;

число ДК, экспрессирующих молекулу CD197 соответствует таковому в ОК или превышает его; более 10 % ДК продуцируют ИЛ-12.

*Условия, при которых исследуемое вещество может рассматриваться как активирующее нейтрофилы периферической крови:*

продукция реактивных форм кислорода (ROS) составляет более 10 % в сравнении с ОК;

усиление интенсивности фагоцитоза на 10 % в сравнении с ОК.

*Условия, при которых исследуемое вещество может рассматриваться как активирующее Т-клетки:*

экспрессия молекулы CD69 после культивирования клеток линии Jurkat-tat с ФМА (25 нг/мл) в качестве ПК составляет не менее 30 %;

экспрессия молекулы CD69 после культивирования клеток Jurkat-tat с иммуномодуляторами составляет не менее 5 % в сравнении с ОК, а экспрессия внутриклеточного ФНО-α – более 5 % в сравнении с ОК.

*Условия, при которых исследуемое вещество может рассматриваться как активирующее В-клетки:*

увеличение интенсивности экспрессии молекул CD80 клетками линии Daudi на 30 % и более в сравнении с ОК;

усиление интенсивности экспрессии молекулы HLA-DR клетками линии Daudi на 30 % и более в сравнении с ОК;

число нежизнеспособных клеток отличается не более чем на 10 % по сравнению с ОК.

**Заключение.** Разработанный метод оценки показал, что ЛС микробного происхождения на основе живых штаммов пробиотических бактерий, а также лизатов бактерий – возбудителей инфекций дыхательных путей и ЛС, содержащие рибосомы и клеточные мембраны, выделенные из возбудителей респираторных инфекций, обладают выраженным стимулирующим действием на АПК, нейтрофилы, В-клетки и, в меньшей степени, на Т-клетки.

Установлено, что наиболее информативными показателями, пригодными для рутинного определения, являются содержание CD80<sup>+</sup>, CD32<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup> ИЛ-12<sup>+</sup> ДК и интенсивность экспрессии молекул CD205 и HLA-DR ДК.

ЛС на основе инозина пранобекса (группа иммуномодуляторов синтетического происхождения) оказали активирующее действие на ДК и В-клетки, что проявилось в усилении экспрессии молекул CD205, HLA-DR и продукции ИЛ-12.

ЛС синтетического и растительного происхождения (на основе умифеновира, азоксимера бромид, полифенола, глюкозаминилмурамилдипептида, сока травы эхинацеи) и тимического происхождения ( $\alpha$ -глутамил-триптофан, экстракт тимуса крупного рогатого скота) не оказали влияния на функциональную активность клеток иммунной системы.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список использованных источников

1. Иммуномодуляторы бактериальной природы, зарегистрированные в Российской Федерации / Т. И. Немировская [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2014. – № 3. – С. 19–26.
2. Guo, R. Complementary medicine for treating or preventing influenza or influenza-like illness / R. Guo, M. H. Pittler, E. Ernst // *Amer. J. Med.* – 2007. – Vol. 120, N 11. – P. 923–929.e3. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.06.031>
3. Фещенко, Ю. И. Особенности современной иммуномодулирующей терапии / Ю. И. Фещенко, Е. М. Рекалова // *Астма та алергія.* – 2013. – № 1. – С. 6–12.
4. Marx, V. Models: stretching the skills of cell lines and mice / V. Marx // *Nat. Meth.* – 2014. – Vol. 11, N 6. – P. 617–620. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2966>
5. Дуж, Е. В. Моноцитарные дендритные клетки как модель для тестирования иммуномодуляторов *in vitro* / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // *Новости мед.-биол. наук.* – 2016. – Т. 13, № 2. – С. 108–116.
6. Methods for testing an immune response using cultures of T cells, B cells, dendritic cells and follicular dendritic cells : pat. US8962319, USA : IPC C12N5/071; C12N5/0781; C12N5/0783; C12N5/0784; C12Q1/00;G01N33/50 (2013.01) / W. L. Warren, D. Drake, J. Moser, I. Singh, H. Song, E. Mishkin, J. G. Tew; publ. date : 24.02.2015.
7. Характеристика культур дендритных клеток для иммунотерапии рака поджелудочной железы / А. Е. Гончаров [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. наук.* – 2014. – № 2. – С. 4–12.
8. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology / J.-C. Lagier [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2015. – Vol. 28, N 1. – P. 208–236. <https://doi.org/10.1128/cmr.00110-14>
9. Дуж, Е. В. Сравнительный профиль экспрессии поверхностных и внутриклеточных молекул Т-лимфоцитарных клеточных линий человека / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // *Новости мед.-биол. наук.* – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 126–134.
10. Оптимизация метода получения дендритных клеток из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга для иммунотерапии пациентов с туберкулезом / А. Е. Гончаров [и др.] // *Докл. НАН Беларусі.* – 2012. – Т. 56, № 4. – С. 94–102.
11. Взаимодействие бифидобактерий и их компонентов с полинуклеарами и мононуклеарами крови человека / Л. П. Титов [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. наук.* – 2013. – № 2. – С. 10–18.
12. Взаимодействие лактобацилл и их компонентов с нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами периферической крови человека / Л. П. Титов [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. наук.* – 2013. – № 3. – С. 19–27.
13. A guide to modern statistical analysis of immunological data / B. Genser [et al.] // *BMC Immunol.* – 2007. – Vol. 8, N 1. – Art. 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-27>

#### References

1. Nemirovskaya T. I., Kovtun V. P., Abramtseva M. V., Aleksandrova N. V., Tarasov A. P., Salakhova R. D., Volkov V. A., Merkulov V. A. Immunomodulators of bacterial origin registered in the Russian Federation. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [Biological products. Prevention, diagnosis, treatment], 2014, no. 3, pp. 19–26 (in Russian).
2. Guo R., Pittler M. H., Ernst E. Complementary medicine for treating or preventing influenza or influenza-like illness. *American Journal of Medicine*, 2007, vol. 120, no. 11, pp. 923–929.e3. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.06.031>

3. Feshchenko Yu. I., Rekalova E. M. The peculiarities of modern immunomodulating therapy. *Astma ta alergiya = Asthma and allergy*, 2013, no. 1, pp. 6–12 (in Ukrainian).

4. Marx V. Models: stretching the skills of cell lines and mice. *Nature Methods*, 2014, vol. 11, no. 6, pp. 617–620. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2966>

5. Duzh E. V., Goncharov A. E. Monocytic dendritic cells as a model for testing immunomodulators in vitro. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2016, vol. 13, no. 2, pp. 108–116 (in Russian).

6. Warren W. L., Drake D., Moser J., Singh I., Song H., Mishkin E., Tew J. G. Methods for testing an immune response using cultures of T cells, B cells, dendritic cells and follicular dendritic cells : pat. US8962319, USA : IPC C12N5/071; C12N5/0781; C12N5/0783; C12N5/0784; C12Q1/00;G01N33/50 (2013.01), 2015.

7. Goncharov A. E., Romanova I. V., Zalutskii I. V., Prokhorov A. V., Papok V. I. Generation of dendritic cells cultured for immunotherapy of pancreatic cancer patients. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2014, no. 2, pp. 4–12 (in Russian).

8. Lagier J.-C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M., Didier R. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 208–236. <https://doi.org/10.1128/cmr.00110-14>

9. Duzh E. V., Goncharov A. E. Comparative profile of surface and intracellular molecule expression of human T-lymphocyte cell lines. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2018, vol. 18, no. 3, pp. 126–134 (in Russian).

10. Goncharov A. E., Titov L. P., Romanova I. V., Skryagin A. E., Solodovnikova V. V., Shpakovskaya N. S., Skryagina E. M. Optimization of the method of dendritic cell generation from hematopoietic bone marrow derived stem cells for the purposes of immunotherapy of patients with tuberculosis. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Reports of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2012, vol. 56, no. 4, pp. 94–102 (in Russian).

11. Titov L. P., Goncharov A. E., Murashko A. S., Golovneva N. A., Kolomiets E. I. Interaction of bifidobacterial and their components with polynuclear and mononuclear human blood cells. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2014, no. 2, pp. 4–12 (in Russian).

12. Titov L. P., Goncharov A. E., Murashko A. S., Golovneva N. A., Naidenko I. A., Kolomiets E. I. Interaction of lactobacilli and their components with neutrophils, monocytes and lymphocytes of human peripheral blood. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2013, no. 3, pp. 19–27 (in Russian).

13. Genser B., Cooper P. J., Yazdanbaksh M., Barreto M. L., Rodrigues L. C. A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunology*, 2007, vol. 8, no. 1, art. 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-27>

### Информация об авторах

Дуж Елена Васильевна – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lenaduzh@gmail.com

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, директор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

### Information about the authors

Alena V. Duzh – Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lenaduzh@gmail.com

Andrei Y. Hancharou – Ph. D. (Med.), Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

**АГЛЯДЫ**  
**REVIEWS**

УДК 57.052+615.035+616.89-008.441.33  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-244-256>

Поступила в редакцию 25.02.2019  
Received 25.02.2019

**И. Н. Семененя, А. Г. Шляхтун, Е. Ф. Радута**

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

**РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ, АКТИВИРУЮЩИХ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ПЕРОКСИСОМ,  
В КОНТРОЛЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ  
И ЛЕЧЕНИИ СОПУТСТВУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ**

**Аннотация.** Настоящий обзор посвящен систематизации разрозненных данных о биологической роли рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPARs), и изучению возможности использования агонистов PPARs в лечении пациентов с алкогольной зависимостью и сопутствующими заболеваниями печени. Рассмотрены наиболее важные работы последних лет, раскрывающие терапевтический потенциал агонистов PPARs в качестве средств для лечения пациентов с алкогольной зависимостью.

**Ключевые слова:** рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом (PPARs), агонисты PPARs, алкоголизм, алкогольная болезнь печени

**Для цитирования:** Семененя, И. Н. Роль рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом, в контроле алкогольной зависимости и лечении сопутствующих заболеваний печени / И. Н. Семененя, А. Г. Шляхтун, Е. Ф. Радута // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 244–256. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-244-256>

**I. N. Semeneniya, A. H. Shlyahtun, H. F. Raduta**

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

**ROLE OF PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS IN THE CONTROL  
OF ALCOHOL DEPENDENCE AND CONCOMITANT LIVER PATHOLOGY**

**Abstract.** The article is aimed to summarize the scattered data on the role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and the possibility of using PPAR's agonists for treatment of alcohol dependence and alcoholic liver disease. Earlier it was shown that some PPAR agonists can reduce ethanol consumption and preference in rodents. Several hypotheses considering the antialcoholic activity of PPAR agonists and the roles of PPAR in the development of alcohol dependence were discussed. In light of these data, the therapeutic potential of PPARs agonists as an agent for the treatment of alcoholism, has been reviewed.

**Keywords:** Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR, alcoholism, alcoholic liver disease

**For citation:** Semeneniya I. N., Shlyahtun A. H., Raduta H. F. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in the control of alcohol dependence and concomitant liver pathology. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 244–256 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-244-256>

**Введение.** С клинической точки зрения алкогольная зависимость – хроническое релапсирующее расстройство с наследственной предрасположенностью, характеризующееся доминантой поиска и получения алкоголя, потерей контроля его потребления, развитием толерантности, за-

висимости и нарушением социальной и трудовой деятельности. Алкогольная зависимость и злоупотребление алкоголем наносят серьезный вред физическому и психическому здоровью населения. По данным доклада ВОЗ за 2018 г., 5,3 % смертей в мире напрямую связаны с алкоголем. Среди сопутствующих заболеваний – сердечно-сосудистая патология (19 %), рак, инфекционные заболевания, сахарный диабет, другие болезни желудочно-кишечного тракта (21 %), а также дорожно-транспортные происшествия (27 %), акты насилия, самоубийства и др.

Лечение алкоголизма остается сложной проблемой. За последние 50 лет только 4 препарата для лечения зависимости от алкоголя были разрешены к применению и получили достаточно широкое распространение в наркологической клинике. Это – ингибитор альдегиддегидрогеназы дисульфирам, антагонист глутамата акампросат и антагонисты опиоидных рецепторов налтрексон и налмефен. У ряда пациентов они вызывают снижение влечения к алкоголю, полный или частичный отказ от его приема, увеличение числа дней трезвости, уменьшение частоты срывов и количества употребляемого алкоголя. Из указанных препаратов для лечения зависимости от алкоголя в Республике Беларусь зарегистрированы и разрешены к применению дисульфирам, налтрексон в форме внутримышечных инъекций и налмефен в виде таблеток.

Клиническая эффективность этих препаратов невысока, часто наблюдаются срывы при всех видах лечения. Кроме того, необходимо принимать во внимание, что лечение дисульфирамом и антагонистами опиоидов не рекомендуется пациентам с алкогольными болезнями печени. Таким образом, поиск новых эффективных препаратов для терапии пациентов с алкогольной зависимостью остается важной медико-социальной проблемой [1].

Высокая стоимость разработки новых лекарственных средств и длительность этого процесса вынудила исследователей во всем мире искать иной подход, а именно: наличие показаний для применения известных лекарственных средств по новому назначению, в том числе и для лечения алкогольной зависимости.

В последние годы показана способность агонистов рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs), снижать влечение к алкоголю и купировать проявления абстиненции у лабораторных животных. К агонистам PPARs относятся фибраты и тиазолидиндионы, используемые для лечения пациентов с атеросклерозом, дислипидемиями и сахарным диабетом. Препараты этих классов уже применяются в клинике, потому не потребуются проведения всего комплекса доклинических исследований при внедрении их в клиническую практику по новому назначению.

Цель настоящего обзора – систематизация разрозненных данных о роли рецепторов, активируемых активаторами пролиферации пероксисом, изучение возможности использования агонистов PPARs в лечении больных с алкогольной зависимостью и сопутствующими заболеваниями печени.

**Структурные свойства PPARs и механизмы регуляции ими экспрессии генов.** PPARs относятся к большому суперсемейству лиганд-индуцируемых ядерных гормональных рецепторов, происходящих, как предполагают, от одного общего предка, существовавшего на ранних этапах эволюции многоклеточных организмов. У млекопитающих идентифицировано три изоформы PPAR: PPAR- $\alpha$  (NR1C1), PPAR- $\gamma$  (NR1C3) и PPAR- $\beta/\delta$  (NR1C2). Первоначально PPARs были обнаружены у лягушек рода *Xenopus* в качестве индукторов пролиферации пероксисом в клетках [2], позднее – в исследованиях по тестированию антигиперлипидемических веществ (фибратов) на грызунах [3]. Фибраты вызывали пролиферацию пероксисом в гепатоцитах, таким образом, молекулярная мишень для фибратов была названа рецептором активаторов пролиферации пероксисом. Впоследствии были обнаружены два других типа этого семейства рецепторов – PPAR $\beta/\delta$  и PPAR $\gamma$  [4].

PPAR – короткоживущие белки молекулярным весом 45–50 кДа. Молекулы PPAR имеют модульную структуру, представленную шестью доменами [5].

Два домена, локализованные вблизи концевых амино- и карбоксильных групп, выполняют функцию активаторов транскрипции (AF-1 и AF-2). ДНК-связывающий домен (DBD), стабилизи-

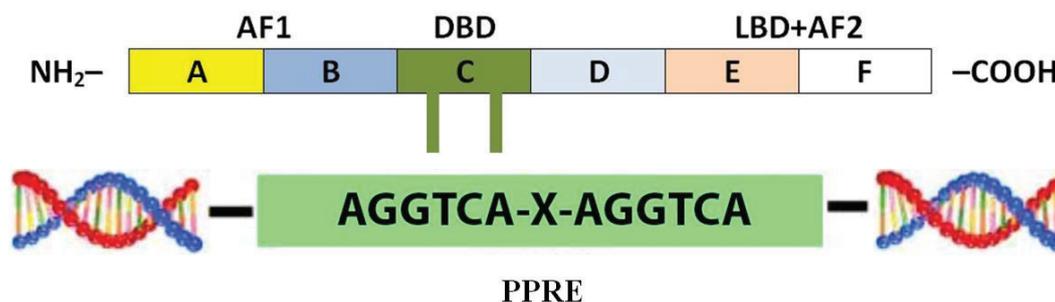


Схема доменной структуры PPARs. AF-1, AF-2 – лиганд-независимые участки с функцией активации, DBD – ДНК-связывающий домен, LBD – лиганд-связывающий домен, PPRE – участок связывания на ДНК, А-F – домены PPARs  
The domain structure of the PPARs. AF-1, AF-2 – ligand-independent sites with an activation function, DBD – DNA-binding domain, LBD – ligand-binding domain, PPRE – binding site on DNA, A-F – PPARs domains

роваемый двумя молекулами цинка («цинковые пальцы»), предназначен для взаимодействия рецептора с отвечающим элементом в промоторе гена-мишени. Лиганд-связывающий домен (LBD) служит для связывания с лигандом, а также для димеризации с ретиноидным X-рецептором. Наконец, шарнирный домен, вокруг которого может происходить пространственное вращение лиганд- и ДНК-связывающих доменов.

PPARs могут регулироваться на различных уровнях – транскрипционном [6], посттранскрипционном [7], трансляционном и посттрансляционном [8]. О молекулярных механизмах регуляции на уровне транскрипции известно относительно мало. Достаточно хорошо изучены посттрансляционные механизмы регуляции PPAR и их активности – белки PPARs подвергаются различным посттрансляционным модификациям, таким как фосфорилирование, СУМОилирование, убиквитинирование, нитрование, за счет чего регулируется их транскрипционный потенциал [8]. Показано, что три домена PPARs – AF-1, лиганд-связывающий и ДНК-связывающий – могут быть фосфорилированы киназами. Фосфорилирование PPARs способно влиять на активацию или инактивацию ядерных рецепторов [9].

PPARs могут активировать или ингибировать экспрессию генов с помощью различных механизмов, основными из которых являются регуляция транскрипции за счет связывания с участком ДНК и регуляция по механизму трансрессии и трансактивации [10].

В первом случае PPAR образуют гетеродимеры с рецептором ретиноевой кислоты (RXR). Образующиеся PPAR/RXR гетеродимеры связываются с ДНК в участках, называемых элементами, отвечающими на пероксисомальные пролифераторы (PPRE), которые состоят из прямых повторов AGG(A/T)CA, разделенных одним или двумя парами оснований. При этом возможен вариант, когда в отсутствие активирующего лиганда гетеродимер PPAR/RXR, находясь в ядре, связан с PPRE и транскрипционным корепрессором, например SMRT, N-CoR [11]. После связывания лиганда PPAR претерпевают конформационные изменения, что позволяет вывести корепрессор для активации транскрипции целевых генов.

Второй механизм – регуляция по механизму трансрессии. В этом случае для регуляции транскрипционной активности не требуется образования гетеродимера PPAR/RXR и связывания PPAR с ДНК. PPARs конкурируют с другими транскрипционными факторами, прежде всего с NF-κB и AP-1, за коактиваторы или сайты связывания на ДНК. Для этого механизма регуляции основными факторами являются уровень экспрессии PPARs и количество белка этих факторов транскрипции.

**Физиологическая роль, гены-мишени и агонисты PPARs.** В отличие от классических стероидных рецепторов, проявляющих высокую специфичность и афинность к стероидным гормонам в наномолярных концентрациях, связывание эндогенных лигандов с PPARs менее специфично. PPAR активируются широким спектром метаболитов и синтетических активаторов при

## Некоторые естественные и синтетические лиганды PPARs

## Some natural and synthetic PPARs ligands

PPAR $\alpha$	PPAR $\beta/\delta$	PPAR $\gamma$
<i>Естественные лиганды</i>		
Свободные жирные кислоты 8(S)-HETE	Свободные жирные кислоты, эйкозаноиды	Свободные жирные кислоты 15d-PGJ2, 15-HETE
<i>Синтетические лиганды-агонисты</i>		
Фибраты WY-14643 [13]	GW0742 [12]	Тиазолидиндионы JTT-501 [14], GW-7845 [15]
<i>Селективные синтетические лиганды-антагонисты</i>		
MK886 [16]	GSK3787 [17]	LG-100641 [18], GW9662 [19]

микромольных концентрациях последних. Некоторые естественные и синтетические лиганды (агонисты и антагонисты) PPARs представлены в таблице.

Рентгеноструктурный анализ структуры лиганд-связывающего кармана показал, что PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$  заметно различаются [12]. В то же время натуральные жирные кислоты могут быть лигандами всех трех изоформ PPARs, причем наибольшей активностью как лиганды PPAR обладают моно- и полиненасыщенные жирные кислоты [13]. Точных данных о том, как происходит различие сигналов на молекулярном уровне, где специфичная, а где общая для всех форм PPARs регуляция, остается неясным.

Все три подтипа PPARs обладают тканеспецифичностью и активируют как перекрывающиеся, так и специфические гены. В частности, PPAR $\alpha$  и PPAR $\beta/\delta$  являются активаторами генов, вовлеченных в окисление липидов [14]. PPAR $\gamma$  выделяется за счет дополнительной способности активировать гены дифференцировки адипоцитов [15].

PPAR $\alpha$  экспрессируется главным образом в тканях с высоким уровнем катаболизма свободных жирных кислот (СЖК) – печени, мозге, бурой и белой жировой тканях, почках, сердце, скелетных мышцах. Впервые обнаруженные в гепатоцитах PPAR $\alpha$  впоследствии были выявлены в клетках эндотелия, макрофагах и лимфоцитах, где они выполняют важную интеграционную функцию, осуществляя синхронизацию энергетических процессов и воспалительного ответа [16].

Основная роль PPAR $\alpha$  заключается в регуляции энергетического метаболизма [17]. В печени и скелетных мышцах, характеризующихся высокой активностью катаболизма и транспорта жирных кислот, рецепторы регулируют экспрессию генов, участвующих в накоплении,  $\alpha$ - и  $\omega$ -окислении СЖК. Наряду с активацией катаболизма СЖК в митохондриях PPAR $\alpha$  стимулируют глюконеогенез и синтез кетоновых тел, контролируют сборку липопротеинов, стимулируя синтез аполипопротеинов А-I и А-II, модулируют скорость синтеза и катаболизма холестерина в гепатоцитах [18], участвуют в регуляции метаболизма аминокислот [19], а также в воспалительном ответе [20].

Регуляция активности PPAR $\alpha$  в тканях, по-видимому, осуществляется через изменение концентрации эндогенных лигандов. Показано физиологическое значение некоторых эндогенных каннабиноидов, которые селективно активируют PPAR $\alpha$  [21].

Помимо гиполлипидемического эффекта, агонисты PPAR $\alpha$  обладают выраженным противоиатеросклеротическим действием, влияя на атерогенез на всех этапах развития этого процесса. Антиатерогенные эффекты PPAR $\alpha$  реализуются главным образом через угнетение транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и активационного белка-1 (AP-1) [22].

PPAR $\gamma$  экспрессируется в жировой ткани, тонком кишечнике и макрофагах, в меньшей степени – в скелетных мышцах, сердце, печени и других тканях. Продуктом гена *PPARG* являются две изоформы рецепторов – PPAR $\gamma$ 1 и PPAR $\gamma$ 2, отличающиеся присутствием 28 аминокислот на NH<sub>2</sub>-конце белка рецептора PPAR $\gamma$ 2 [23]. PPAR $\gamma$  являются важнейшими регуляторами гиперплазии и гипертрофии адипоцитов, что особенно отчетливо проявляется при содержании животных

на жировой диете. Изучение функции PPAR $\gamma$  в жировой ткани позволило выявить доминантную роль этого транскрипционного фактора в поддержании гомеостаза глюкозы, липидов и холестерина в организме [24]. Обнаружено, что PPAR $\gamma$  регулируют также секрецию гормонов адипоцитов, обеспечивая изменение содержания глюкозы в тканях через повышение чувствительности клеток к инсулиновому рецептору [25].

Из трех известных в настоящее время представителей семейства PPARs тип PPAR $\beta/\delta$  наиболее широко экспрессируется в различных тканях, но его функциональные свойства наименее изучены. Активация PPAR $\beta/\delta$  в скелетных и сердечной мышцах, а также в других тканях оказывает влияние на клеточный рост, гомеостаз глюкозы, липидный обмен и протекание воспалительных реакций. Активация PPAR $\beta/\delta$  приводит к повышению экспрессии генов, участвующих в окислении жирных кислот, таких как ACOX1, CPT-1, VLCAD и LCAD. PPAR $\beta/\delta$  активирует также гены ферментов, участвующих в метаболизме триацилглицеролов в бурой жировой ткани, таких как гормон-чувствительная липаза и UCP1 [26].

**Роль PPARs в контроле потребления и предпочтения алкоголя.** Накопленные за последнее десятилетие экспериментальные данные, полученные на грызунах с генетической предрасположенностью к употреблению больших количеств алкоголя, свидетельствуют о том, что агонисты PPAR различных классов способны снижать уровни потребления и предпочтения алкоголя. Так, показано, что агонист PPAR $\alpha$  гемфиброзил снижает добровольное потребление этанола у крыс линии Sprague-Dawley [27]. Агонисты PPAR $\gamma$  пиоглитазон и росиглитазон также уменьшают потребление этанола и выраженность проявлений отмены этанола [28] и усиливают действие налтрексона у крыс линии msP [29]. Зарегистрированное снижение уровней потребления этанола в представленных работах варьировалось от 20 до 70 % в зависимости от используемого агониста PPARs, дозировки препарата и вида теста для оценки потребления этанола. Кроме того, антиалкогольное действие агонистов PPARs оказалось связанным с полом животных – эффект наблюдается преимущественно у самцов и значительно менее выражен у самок. Подобные же эффекты, зависящие от пола животных, были зарегистрированы и в других исследованиях агонистов PPARs, например в исследовании действия различных препаратов на развитие болевой гиперчувствительности у мышей разных линий (Crl:ICR, Crl:CD1-Foxn1<sup>nu</sup>, C57BL/6J, Rag1<sup>-/-</sup>), где показано, что фенофибрат снижает аллодинию и гипералгезию только у самцов, но не у самок мышей, тогда как пиоглитазон действует только на самок, но не на самцов [30].

В ряде работ Y. A. Blednov с соавт. [31–33], посвященных исследованию антиалкогольных эффектов агонистов PPARs, показано, что агонист PPAR $\alpha$ , фенофибрат, и смешанный агонист PPAR $\alpha/\gamma$ , тезаглитазар, снижают потребление и предпочтение этанола у мышей дикого типа, но эти эффекты не наблюдаются у мышей, нокаутных по гену *PPAR $\alpha$* . Кроме того, показано, что селективный антагонист PPAR $\alpha$ , MK886, в условиях эксперимента ингибировал действие фенофибрата, но не тезаглитазара. Агонисты PPAR были более эффективны у мышей-самцов по сравнению с самками. В представленной серии работ показано, что наиболее выраженным антиалкогольным действием обладают препараты – агонисты рецепторов PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$ .

Данные полногеномного поиска ассоциаций по генетике алкоголизма подтверждают связь однонуклеотидных полиморфизмов в генах *PPAR $\alpha$*  и *PPAR $\gamma$* , а также коактиватора PGC-1 $\alpha$  с алкогольной зависимостью и отсутствие связи с PPAR- $\beta/\delta$ . В целом, эти данные и результаты исследования влияния агонистов PPARs на потребление и предпочтение алкоголя в условиях свободного выбора на грызунах подтверждают участие PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  в развитии алкогольной зависимости у человека и животных [31], однако задействованные при этом сигнальные пути до настоящего времени не установлены.

Для объяснения молекулярных механизмов антиалкогольного действия агонистов PPARs предложено несколько гипотез.

Одной из первых была предложена «каталазно-ацетальдегидная» гипотеза (в оригинальной работе E. Karahanian «catalase blood-acetaldehyde hypothesis»), объясняющая механизм антиалкогольного действия агонистов PPAR $\alpha$  путем усиления пролиферации пероксисом в печени и уве-

личения уровней экспрессии каталазы, способной участвовать в окислении этанола до ацетальдегида. Согласно этой гипотезе, увеличенная системная продукция ацетальдегида в печени и повышение его уровня в крови и обуславливает антиалкогольное действие агонистов PPARs за счет развития аверсивной реакции [34]. Авторами показано трехкратное увеличение активности каталазы в печени и десятикратное увеличение уровня ацетальдегида в крови у крыс линии UChV, которые получали фенофибрат на фоне потребления алкоголя, по сравнению с животными, не получавшими препарат. Зарегистрированное снижение потребления этанола у крыс под действием фенофибрата составило около 70 %.

В Гродненском филиале Института фармакологии и биохимии НАН Беларуси также было показано, что клофибрат и ди-2-этилгексилфталат, являющийся агонистом PPAR $\alpha$ , существенно меняют активность ферментных систем, метаболизирующих этанол в печени, – под их влиянием увеличивалась активность каталазы, алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и микросомальной этанол-окисляющей системы [35].

«Каталазно-ацетальдегидная» гипотеза не объясняет эффекты агонистов PPARs, зависящие от пола животных, поэтому имеющиеся данные не позволяют однозначно принимать данную гипотезу.

Согласно ряду публикаций, возможные механизмы антиалкогольного действия агонистов PPARs могут быть связаны с изменением уровней экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию нейромедиаторных путей, которые связаны с механизмами подкрепления и развития зависимости.

Основную роль в механизмах подкрепления и аддикции отводят дофаминергическим системам вентральной области покрышки, прилежащему ядру и нейронам медиального переднего мозга, а также нейронам гипоталамуса, регулирующим пищевое и питьевое поведение. Изучение профиля экспрессии генов в важных для развития алкогольной зависимости областях мозга при введении мышам линии C57BL/6J агониста PPAR $\alpha$  фенофибрата и смешанного агониста PPAR $\alpha/\gamma$  тезаглитазара в условиях стандартного двухбутылочного теста предпочтения алкоголя показало, что агонисты PPAR изменяют экспрессию генов, участвующих в регуляции нейропептидных и дофаминергических сигнальных путей в миндалине [36].

Авторами настоящего обзора при исследовании влияния агонистов PPAR – клофибрата и метформина – на уровне потребления этанола в условиях свободного его выбора и обмен нейромедиаторов в отделах головного мозга у крыс с высоким уровнем предпочтения этанола показано, что под влиянием обоих препаратов происходит снижение объемов потребления этанола в среднем на 40–45 % по сравнению с показателями до их введения. Наиболее выраженные изменения в содержании нейроактивных аминокислот, биогенных аминов и их производных были отмечены в гипоталамусе, а в таких отделах мозга, как кора, стриатум, гиппокамп и мозжечок, их уровни значимо не изменялись. Показано, что под влиянием клофибрата и метформина происходит нормализация обмена дофамина и серотонина в гипоталамусе у крыс с высоким уровнем предпочтения этанола, что частично объясняет наблюдаемый антиалкогольный эффект агонистов PPARs [37].

Недавно было показано, что определенную роль в формировании алкогольной зависимости может играть развитие воспалительных реакций в нервной ткани, опосредуемое через TNF $\alpha$ , TLR4 и NF- $\kappa$ B сигнальные пути [38]. Противовоспалительное действие и молекулярные механизмы действия агонистов PPARs достаточно хорошо изучены. Способность PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  влиять на противовоспалительный ответ обусловлена активацией противовоспалительных генов и лиганд-зависимой транскрепрессией, в ходе которой ингибируется активность провоспалительных транскрипционных факторов, таких как NF- $\kappa$ B. Среди провоспалительных генов, экспрессия которых также ингибируется через механизм транскрепрессии, выделяют *AP-1*, *STAT-1* и *NFAT* [39].

Таким образом, одним из возможных механизмов антиалкогольного действия агонистов PPARs может быть их способность снижать уровни воспалительных реакций в глии и нейронах.

Показано, что агонисты PPARs способны влиять на экспрессию генов цитозольной и секреторной фосфолипазы A2 и циклооксигеназ в клетках астроглии. В работах С. Е. Алешина с соавт. исследовано влияние синтетических агонистов PPAR – GW7647 (агонист PPAR $\alpha$ ), L-165041 (агонист PPAR $\beta/\delta$ ) и росиглитазона (агонист PPAR $\gamma$ ) на экспрессию генов цитозольной и секреторной фосфолипазы A2 и циклооксигеназ в культуре астроцитов крыс. Показано, что GW7647 увеличивает экспрессию PPAR $\beta$ , COX-1 и уменьшает экспрессию цитозольной и секреторной фосфолипаз A2; L-165041 увеличивает экспрессию PPAR $\beta$ ; COX-1 и снижает экспрессию PPAR $\alpha$ , цитозольной и секреторной фосфолипаз A2; росиглитазон снижает уровни экспрессии PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , COX-2, цитозольной и секреторной фосфолипаз A2. Таким образом, синтетические агонисты всех трех изоформ PPAR оказывают влияние на экспрессию PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Другими словами, лиганды одной изоформы PPAR способны не только изменять экспрессию другой изоформы, но и влиять на уровни экспрессии цитозольной и секреторной фосфолипаз A2 и циклооксигеназ, вовлеченных в воспалительные реакции [40].

Подытоживая приведенные выше данные, отметим, что роль PPARs и точные молекулярные механизмы действия их агонистов при развитии алкогольной зависимости до настоящего момента не установлены. Показано, что эффективность ряда агонистов PPARs, прежде всего PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$ , в снижении проявлений алкогольной зависимости у животных сравнима с эффективностью препаратов, используемых в настоящее время в клинике. Несмотря на отсутствие точных молекулярных механизмов антиалкогольного действия агонистов PPARs, представляется обоснованным изучить возможность использования этих соединений самостоятельно или в комбинации с другими препаратами у пациентов с алкогольной зависимостью с целью снижения влечения к алкоголю и уменьшения выраженности состояния отмены алкоголя.

**Роль агонистов PPARs в терапии алкогольной болезни печени.** Алкогольная болезнь печени – это группа нозологических форм, обусловленных повреждающим действием этанола на клетки печени. По клиническим и морфологическим критериям выделяют три ее основные формы: стеатоз, гепатит и цирроз.

Известно, что злоупотребление алкоголем нарушает структуру и функционирование органов и тканей, прежде всего печени, где в основном происходит метаболизм этанола. Среди важнейших механизмов повреждающего действия этанола на печень следует отметить активацию свободнорадикальных реакций, индукцию воспалительного процесса и непосредственное действие этанола и ацетальдегида на гепатоциты. В развитии алкогольного гепатита важную роль играют провоспалительные цитокины, выделяемые клетками Купфера или инфильтрирующими печень нейтрофилами и макрофагами. Воздействие реактивных соединений кислорода и азота, генерируемых в ответ на индуцированное цитокинами стрессорное сигнализирование в паренхиматозных, купферовских клетках и макрофагах, ведет к дальнейшему истощению защитных клеточных механизмов.

Среди алкогольных поражений печени особое значение имеют хронические стеатогепатиты, которые при неблагоприятном течении приводят к фиброзу и циррозу печени. Как показывает мировая медицинская практика, на сегодняшний день эффективных фармакологических средств для лечения цирроза печени не существует. Для лечения таких пациентов используются глюкокортикоидные препараты, гепатопротекторы и другие паллиативные средства.

Имеющиеся литературные данные о роли различных типов PPARs в развитии алкогольной болезни печени противоречивы. Активация PPAR $\alpha$  рассматривается как потенциально новый терапевтический подход в лечении алкогольной болезни печени [41]. Показано, что при активации PPAR $\alpha$  агонистом WY14643 у мышей, содержащихся в течение 12 недель на алкогольной диете по Lieber-DeCarli, снижались признаки стеатогепатита и уменьшалась лимфоцитарная инфильтрация печени [42]. У пациентов с гепатитом при избыточном употреблении алкоголя экспрессия PPAR $\alpha$  в клетках печени снижена, что приводит к накоплению липидов, усилению оксидативного стресса и воспаления [43]. У мышей, нокаутных по гену PPAR $\gamma$ , наоборот, алкогольный

стеатогепатит не развіваецца. В эксперыментах адзначана зніжэнне накоплення трыацылгліцэролаў у печыні, зніжэнне узроўняў воспалительнай інфільтрацыі, прадукцыі првоспалительных цытокінаў і морфалагічных прызнакаў павреждения печыні [44]. Аднак у другіх эксперыментах паказана, што тиазолідіндыоны, поўныя агоністы PPAR $\gamma$ , *in vitro* спосабствуюць стеатозу гепатоцытаў, а *in vivo* зніжаюць стеатоз пасредствам увелічэння прадукцыі адіпонектіна [45]. Кромэ таго, паказана, што дэфіцыт PPAR $\gamma$  ў звездчатых клетках печыні асацыіраван з трансдиференцыяцыяй і актывацыяй гэтых клетак, ізбыточным абразаваннем фібрознай ткані ў печыні і прагрэсаваннем фіброза [46]. Імаецца адзіночнае існаванне, выявіўшае пратекторны эфект PPAR $\beta/\delta$  пры алкагольнай балежні за счэт зніжэння узроўняў воспалення, акіслительнага стрэса, ліпатокасічнасці і інсулінорэзістэнтнасці [47].

Кромэ таго, паказана, што элементы, адвечаючыя на пераксісасмальныя праліфератары (PPRE), ідэнтыфіцыраваны ў промоторных участках генаў некаторых ферментаў антэаксідантнай сістэмы, ў частнасці каталазы [48] і Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>-супероксідыдсмутазы [49].

В нашасяе врэмя агоністы PPARs не існавуюць ў клініцы для лэчэння пацыентаў с алкагольнай балежню печыні. Благодаря ўнікальнай спосабнасці кантраляваць мэтаболізм жырных кіслат і зніжаць узроўняў воспалення агоністы PPARs могуць іграць сусшэствэнную ролю ў лэчэнні пацыентаў с алкагольным стеатозам і стеатогепатітам, дэйсваю на патогенетычэскія звэнья развіцця гэтых забалеваньняў.

**Заклученне.** Накаплена дастаточная даказатэльная база аб эфектыўнасці дэйсваа агоністаў PPARs на праявлэння алкагольнай завасінасці і алкагольнай балежні печыні ў жывотных. Учэтывая, што некаторыя агоністы PPARs ўжэ прымяняюць ў клініцы, прэдставаляецца абаснаваным існаваць спосабнасць існававання гэтых прэпаратаў самасястэльна ілі ў камбанацыі с другімі лэкарственымі срсдствамі ў пацыентаў с алкагольнай завасінасцю с чэлю зніжэння влэчэння к алкаголю і ўмэньшэння выражэннасці сасянаа атмэны алкаголя.

**Конфлікт існавава.** Аваора заявляюць аб адсутствіі конфлікта існавава.

#### Спісок існававава існавава

1. Miller, P. M. Medical treatment of alcohol dependence: a systematic review / P. M. Miller, S. W. Book, S. H. Stewart // *Int. J. Psychiatry Med.* – 2011. – Vol. 42, N 3. – P. 227–266. <https://doi.org/10.2190/PM.42.3.b>
2. Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors / C. Dreyer [et al.] // *Cell.* – 1992. – Vol. 68, N 5. – P. 879–887. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90031-7)
3. Issemann, I. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators / I. Issemann, S. Green // *Nature.* – 1990. – Vol. 347, N 6294. – P. 645–650. <https://doi.org/10.1038/347645a0>
4. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors / S. A. Kliewer [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 91, N 15. – P. 7355–7359. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7355>
5. Grygiel-Górniak, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review / B. Grygiel-Górniak // *Nutr. J.* – 2014. – Vol. 13. – Art. 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>
6. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  expression during lung inflammation / J. Becker [et al.] // *Pulm. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol. 21, N 2. – P. 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.08.001>
7. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms / E. Mueller [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 44. – P. 41925–41930. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206950200>
8. Brunmeir, R. Functional regulation of PPARs through post-translational modifications / R. Brunmeir, F. Xu // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 6. – Art. 1738. <https://doi.org/10.3390/ijms19061738>
9. Rochette-Egly, C. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation / C. Rochette-Egly // *Cell Signal.* – 2003. – Vol. 15, N 4. – P. 355–366. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00115-8](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00115-8)
10. Zoete, V. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators / V. Zoete, A. Grosdidier, O. Michielin // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids.* – 2007. – Vol. 1771, N 8. – P. 915–925. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.01.007>
11. Sonoda, J. Nuclear receptors: decoding metabolic disease / J. Sonoda, L. Pei, R. M. Evans // *FEBS Lett.* – 2008. – Vol. 582, N 1. – P. 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.016>

12. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors / H. E. Xu [et al.] // *Mol. Cell.* – 1999. – Vol. 3, N 3. – P. 397–403. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80467-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80467-0)
13. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay / G. Krey [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 1997. – Vol. 11, N 6. – P. 779–791. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0007>
14. Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1 alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes / M. J. Watt [et al.] // *J. Mol. Endocrinol.* – 2004. – Vol. 33, N 2. – P. 533–544. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01499>
15. Siersbaek, R. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism – novel insights from genome-wide studies / R. Siersbaek, R. Nielsen, S. Mandrup // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584, N 15. – P. 3242–3249. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.010>
16. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat / O. Braissant [et al.] // *Endocrinology.* – 1996. – Vol. 137, N 1. – P. 354–366. <https://doi.org/10.1210/endo.137.1.8536636>
17. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis / P. Lefebvre [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116, N 3. – P. 571–580. <https://doi.org/10.1172/JCI27989>
18. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism / B. Staels [et al.] // *Circulation.* – 1998. – Vol. 98, N 19. – P. 2088–2093. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.19.2088>
19. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism / S. Kersten [et al.] // *FASEB J.* – 2001. – Vol. 15, N 11. – P. 1971–1978. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0147com>
20. PPAR alpha regulation of the immune response and autoimmune encephalomyelitis / Y. Yang [et al.] // *PPAR Res.* – 2008. – Vol. 2008. – Art. ID 546753. <https://doi.org/10.1155/2008/546753>
21. Cannabinoids and PPARalpha signaling / Y. Sun [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – Vol. 34, N 6. – P. 1095–1097. <https://doi.org/10.1042/BST0341095>
22. Linoleic acid-enriched phospholipids act through peroxisome proliferator-activated receptors alpha to stimulate hepatic apolipoprotein A-I secretion / N. R. Pandey [et al.] // *Biochemistry.* – 2008. – Vol. 47, N 6. – P. 1579–1587. <https://doi.org/10.1021/bi702148f>
23. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene / L. Fajas [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, N 30. – P. 18779–18789. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18779>
24. PPARγ overexpression regulates cholesterol metabolism in human L02 hepatocytes / T. Han [et al.] // *J. Pharmacol. Sci.* – 2019. – Vol. 139, N 1. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.09.013>
25. Wang, S. PPARγ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics / S. Wang, E. J. Dougherty, R. L. Danner // *Pharmacol. Res.* – 2016. – Vol. 111. – P. 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.02.028>
26. PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation / J. Nedergaard [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids.* – 2005. – Vol. 1740, N 2. – P. 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.02.003>
27. Positive relationship between dietary fat, ethanol intake, triglycerides, and hypothalamic peptides: counteraction by lipid-lowering drugs / J. R. Barson [et al.] // *Alcohol.* – 2009. – Vol. 43, N 6. – P. 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.07.003>
28. Activation of nuclear PPARγ receptors by the antidiabetic agent pioglitazone suppresses alcohol drinking and relapse to alcohol seeking / S. Stopponi [et al.] // *Biol. Psychiatry.* – 2011. – Vol. 69, N 7. – P. 642–649. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.12.010>
29. Activation of PPARγ by pioglitazone potentiates the effects of naltrexone on alcohol drinking and relapse in msP rats / S. Stopponi [et al.] // *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* – 2013. – Vol. 37, N 8. – P. 1351–1360. <https://doi.org/10.1111/acer.12091>
30. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice / R. E. Sorge [et al.] // *Nat. Neurosci.* – 2015. – Vol. 18, N 8. – P. 1081–1083. <https://doi.org/10.1038/nn.4053>
31. Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are linked with alcohol consumption in mice and withdrawal and dependence in humans / Y. A. Blednov [et al.] // *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* – 2015. – Vol. 39, N 1. – P. 136–145. <https://doi.org/10.1111/acer.12610>
32. PPAR agonists: I. Role of receptor subunits in alcohol consumption in male and female mice / Y. A. Blednov [et al.] // *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* – 2016. – Vol. 40, N 3. – P. 553–562. <https://doi.org/10.1111/acer.12976>
33. PPAR agonists: II. Fenofibrate and tesaglitazar alter behaviors related to voluntary alcohol consumption / Y. A. Blednov [et al.] // *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* – 2016. – Vol. 40, N 3. – P. 563–571. <https://doi.org/10.1111/acer.12972>
34. Fenofibrate – a lipid-lowering drug – reduces voluntary alcohol drinking in rats / E. Karahanian [et al.] // *Alcohol.* – 2014. – Vol. 48, N 7. – P. 665–670. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.08.004>
35. Влияние активаторов и ингибиторов каталазы на показатели фармакокинетики этанола и активность ферментов метаболизма этанола и ацетальдегида печени и мозга крыс / Л. П. Бардина [и др.] // *Биомед. химия.* – 2010. – Т. 56, № 4. – С. 499–505.

36. PPAR agonists regulate brain gene expression: Relationship to their effects on ethanol consumption / L. B. Ferguson [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2014. – Vol. 86. – P. 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.024>
37. Новые фармакологические подходы в терапии алкогольной зависимости: агонисты PPAR-рецепторов / А. Г. Шляхтун [и др.] // *Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии* : сб. науч. ст., Гродно, 17–18 мая 2018 г. / НАН Беларуси, Ин-т биохимии биол. активных соединений НАН Беларуси ; под общ. ред. И. Н. Семенени, А. Г. Мойсеенка. – Минск, 2018. – С. 730–735.
38. Kelley, K. W. Alcoholism and inflammation: neuroimmunology of behavioral and mood disorders / K. W. Kelley, R. Dantzer // *Brain Behav. Immun.* – 2011. – Vol. 25, Suppl. 1. – P. S13–S20. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.12.013>
39. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation / C. Blanquart [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 85, N 2–5. – P. 267–273. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00214-0](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00214-0)
40. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma positively controls and PPARalpha negatively controls cyclooxygenase-2 expression in rat brain astrocytes through a convergence on PPARbeta/delta via mutual control of PPAR expression levels / S. Aleshin [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 76, N 2. – P. 414–424. <https://doi.org/10.1124/mol.109.056010>
41. Nan, Y.-M. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , a potential therapeutic target for alcoholic liver disease / Y.-M. Nan, R.-Q. Wang, N. Fu // *World J Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20, N 25. – P. 8055–8060. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8055>
42. Activation of peroxisome proliferator activated receptor alpha ameliorates ethanol induced steatohepatitis in mice / L. Kong [et al.] // *Lipids Health. Dis.* – 2011. – Vol. 10. – Art. 246. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-246>
43. Alteration of hepatic nuclear receptor-mediated signaling pathways in hepatitis C virus patients with and without a history of alcohol drinking / C. Wu [et al.] // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 54, N 6. – P. 1966–1974. <https://doi.org/10.1002/hep.24645>
44. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling contributes to alcohol-induced hepatic steatosis and inflammation in mice / W. Zhang [et al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2016. – Vol. 40, N 5. – P. 988–999. <https://doi.org/10.1111/acer.13049>
45. The ameliorating effect of rosiglitazone on experimental nonalcoholic steatohepatitis is associated with regulating adiponectin receptor expression in rats / S. Liu [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 650, N 1. – P. 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.082>
46. Zhang, F. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  cross-regulation of signaling events implicated in liver fibrogenesis / F. Zhang, Y. Lu, S. Zheng // *Cell. Signal.* – 2012. – Vol. 24, N 3. – P. 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.11.008>
47. PPAR $\delta$  agonist attenuates alcohol-induced hepatic insulin resistance and improves liver injury and repair / M. Pang [et al.] // *J. Hepatol.* – 2009. – Vol. 50, N 6. – P. 1192–1201. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.021>
48. Differential activation of catalase expression and activity by PPAR agonists: implications for astrocyte protection in anti-glioma therapy / N. K. H. Khoo [et al.] // *Redox Biol.* – 2013. – Vol. 1, N 1. – P. 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.006>
49. Fenofibrate decreases radiation sensitivity via peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -mediated superoxide dismutase induction in HeLa cells / X. Liu [et al.] // *Radiat. Oncol. J.* – 2012. – Vol. 30, N 2. – P. 88–95. <https://doi.org/10.3857/roj.2012.30.2.88>

## References

1. Miller P. M., Book S. W., Stewart S. H. Medical treatment of alcohol dependence: a systematic review. *International Journal of Psychiatry*, 2011, vol. 42, no. 3, pp. 227–266. <https://doi.org/10.2190/PM.42.3.b>
2. Dreyer C., Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G., Wahli W. Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 1992, vol. 68, no. 5, pp. 879–887. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90031-7)
3. Issemann I., Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990, vol. 347, no. 6294, pp. 645–650. <https://doi.org/10.1038/347645a0>
4. Kliewer S. A., Forman B. M., Blumberg B., Ong E. S., Borgmeyer U., Mangelsdorf D. J., Umesono K., Evans R. M. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, vol. 91, no. 15, pp. 7355–7359. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7355>
5. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutrition Journal*, 2014, vol. 13, art. 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>
6. Becker J., Delayre-Orthez C., Frossard N., Pons F. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha expression during lung inflammation. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 2008, vol. 21, no. 2, pp. 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.08.001>

7. Mueller E., Drori S., Aiyer A., Yie J., Sarraf P., Chen H. [et al.]. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 44, pp. 41925–41930. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206950200>
8. Brunmeir R., Xu F. Functional regulation of PPARs through post-translational modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, no. 6, art. 1738. <https://doi.org/10.3390/ijms19061738>
9. Rochette-Egly C. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cellular Signalling*, 2003, vol. 15, no. 4, pp. 355–366. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00115-8](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00115-8)
10. Zoete V., Grosdidier A., Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2007, vol. 1771, no. 8, pp. 915–925. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.01.007>
11. Sonoda J., Pei L., Evans R. M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Letters*, 2008, vol. 582, no. 1, pp. 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.016>
12. Xu H. E., Lambert M. H., Montana V. G., Parks D. J., Blanchard S. G., Brown P. J. [et al.]. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Molecular Cell*, 1999, vol. 3, no. 3, pp. 397–403. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80467-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80467-0)
13. Krey G., Braissant O., L'Horsset F., Kalkhoven E., Perroud M., Parker M. G., Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular Endocrinology*, 1997, vol. 11, no. 6, pp. 779–791. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0007>
14. Watt M. J., Southgate R. J., Holmes A. G., Febbraio M. A. Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1 alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, vol. 33, no. 2, pp. 533–544. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01499>
15. Siersbaek R., Nielsen R., Mandrup S. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism – novel insights from genome-wide studies. *FEBS Letters*, 2010, vol. 584, no. 15, pp. 3242–3249. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.010>
16. Braissant O., Fougelle F., Scotto C., Dauça M., Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 1996, vol. 137, no. 1, pp. 354–366. <https://doi.org/10.1210/endo.137.1.8536636>
17. Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J.-Ch., Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, vol. 116, no. 3, pp. 571–580. <https://doi.org/10.1172/JCI27989>
18. Staels B., Dallongeville J., Auwerx J., Schoonjans K., Leitersdorf E., Fruchart J.-Ch. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, 1998, vol. 98, no. 19, pp. 2088–2093. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.19.2088>
19. Kersten S., Mandard S., Escher P., Gonzalez F. J., Tafuri S., Desvergne B., Wahli W. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. *FASEB Journal*, 2001, vol. 15, no. 11, pp. 1971–1978. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0147com>
20. Yang Y., Gocke A. R., Lovett-Racke A., Drew P. D., Racke M. K. PPAR alpha regulation of the immune response and autoimmune encephalomyelitis. *PPAR Research*, 2008, vol. 2008, art. ID 546753. <https://doi.org/10.1155/2008/546753>
21. Sun Y., Alexander S. P. H., Kendall D. A., Bennett A. J. Cannabinoids and PPARalpha signaling. *Biochemical Society Transactions*, 2006, vol. 34, no. 6, pp. 1095–1097. <https://doi.org/10.1042/BST0341095>
22. Pandey N. R., Renwick J., Misquith A., Sokoll K., Sparks D. L. Linoleic acid-enriched phospholipids act through peroxisome proliferator-activated receptors alpha to stimulate hepatic apolipoprotein A-I secretion. *Biochemistry*, 2008, vol. 47, no. 6, pp. 1579–1587. <https://doi.org/10.1021/bi702148f>
23. Fajas L., Auboeuf D., Raspé E., Schoonjans K., Lefebvre A.-M., Saladin R. [et al.]. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, no. 30, pp. 18779–18789. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18779>
24. Han T., Lv Y., Wang S., Hu T., Hong H., Fu Z. PPARγ overexpression regulates cholesterol metabolism in human L02 hepatocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2019, vol. 139, no. 1, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.09.013>
25. Wang S., Dougherty E. J., Danner R. L. PPARγ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics. *Pharmacological Research*, 2016, vol. 111, pp. 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.02.028>
26. Nedergaard J., Petrovic N., Lindgren E. M., Jacobsson A., Cannon B. PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 2005, vol. 1740, no. 2, pp. 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.02.003>

27. Barson J. R., Karatayev O., Chang G.-Q., Johnson D. F., Bocarsly M. E., Hoebel B. G., Leibowitz S. F. Positive relationship between dietary fat, ethanol intake, triglycerides, and hypothalamic peptides: counteraction by lipid-lowering drugs. *Alcohol*, 2009, vol. 43, no. 6, pp. 433–441 <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.07.003>
28. Stopponi S., Somaini L., Cippitelli A., Cannella N., Braconi S., Kallupi M. [et al.]. Activation of nuclear PPAR $\gamma$  receptors by the antidiabetic agent pioglitazone suppresses alcohol drinking and relapse to alcohol seeking. *Biological Psychiatry*, 2011, vol. 69, no. 7, pp. 642–649. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.12.010>
29. Stopponi S., de Guglielmo G., Somaini L., Cippitelli A., Cannella N., Kallupi M. [et al.]. Activation of PPAR $\gamma$  by pioglitazone potentiates the effects of naltrexone on alcohol drinking and relapse in msP rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2013, vol. 37, no. 8, pp. 1351–1360. <https://doi.org/10.1111/acer.12091>
30. Sorge R. E., Mapplebeck J. C. S., Rosen S., Beggs S., Taves S., Alexander J. K. [et al.]. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience*, 2015, vol. 18, no. 8, pp. 1081–1083. <https://doi.org/10.1038/nn.4053>
31. Blednov Y. A., Benavidez J. M., Black M., Ferguson L. B., Schoenhard G. L., Goate A. M. [et al.]. Peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  are linked with alcohol consumption in mice and withdrawal and dependence in humans. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2015, vol. 39, no. 1, pp. 136–145. <https://doi.org/10.1111/acer.12610>
32. Blednov Y. A., Black M., Benavidez J. M., Stamatakis E. E., Harris R. A. PPAR agonists: I. Role of receptor subunits in alcohol consumption in male and female mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2016, vol. 40, no. 3, pp. 553–562. <https://doi.org/10.1111/acer.12976>
33. Blednov Y. A., Black M., Benavidez J. M., Stamatakis E. E., Harris R. A. PPAR agonists: II. Fenofibrate and tesaglitazar alter behaviors related to voluntary alcohol consumption. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2016, vol. 40, no. 3, pp. 563–571. <https://doi.org/10.1111/acer.12972>
34. Karahanian E., Quintanilla M. E., Fernandez K., Israel Y. Fenofibrate – a lipid-lowering drug – reduces voluntary alcohol drinking in rats. *Alcohol*, 2014, vol. 48, no. 7, pp. 665–670. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.08.004>
35. Bardina L. R., Pron'ko P. S., Satanovskaya V. I., Alieva E. V. Effects of catalase activators and inhibitors on ethanol pharmacokinetics and the activity of enzymes involved in metabolism of ethanol and acetaldehyde in the liver and brain of rats. *Biomeditsinskaya khimiya* [Biomedical chemistry], 2010, vol. 56, no. 4, pp. 499–505 (in Russian).
36. Ferguson L. B., Most D., Blednov Y. A., Harris R. A. PPAR agonists regulate brain gene expression: Relationship to their effects on ethanol consumption. *Neuropharmacology*, 2014, vol. 86, pp. 397–407 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.024>
37. Shlyakhtun A. G., Buben A. L., Loban' Yu. V., Satanovskaya V. I., Pron'ko P. S. New pharmacological approaches in the treatment of alcohol dependence: PPAR receptor agonists. *Sovremennye problemy biokhimii i molekulyarnoi biologii: sbornik nauchnykh statei (Grodno, 17–18 maya 2018 goda)* [Modern problems of biochemistry and molecular biology: a collection of scientific articles (Grodno, May 17–18, 2018)]. Minsk, 2018, pp. 730–735 (in Russian).
38. Kelley K. W., Dantzer R. Alcoholism and inflammation: neuroimmunology of behavioral and mood disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2011, vol. 25, suppl. 1, pp. S13–S20. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.12.013>
39. Blanquart C., Barbier O., Fruchart J. Ch., Staels B., Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, vol. 85, no. 2–5, pp. 267–273. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00214-0](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00214-0)
40. Aleshin S., Grabeklis S., Hanck T., Sergeeva M., Reiser G. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  positively controls and PPAR $\alpha$  negatively controls cyclooxygenase-2 expression in rat brain astrocytes through a convergence on PPAR $\beta/\delta$  via mutual control of PPAR expression levels. *Molecular Pharmacology*, 2009, vol. 76, no. 2, pp. 414–424. <https://doi.org/10.1124/mol.109.056010>
41. Nan Y.-M., Wang R.-Q., Fu N. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , a potential therapeutic target for alcoholic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, vol. 20, no. 25, pp. 8055–8060. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8055>
42. Kong L., Ren W., Li W., Zhao S., Mi H., Wang R., Zhang Y., Wu W., Nan Y., Yu J. Activation of peroxisome proliferator activated receptor alpha ameliorates ethanol induced steatohepatitis in mice. *Lipids in Health and Diseases*, 2011, vol. 10, art. 246. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-246>
43. Wu C., Gilroy R., Taylor R., Olyae M., Abdulkarim B., Forster J., O'Neil M., Damjanov I., Wan Y.-J. Y. Alteration of hepatic nuclear receptor-mediated signaling pathways in hepatitis C virus patients with and without a history of alcohol drinking. *Hepatology*, 2011, vol. 54, no. 6, pp. 1966–1974. <https://doi.org/10.1002/hep.24645>
44. Zhang W., Sun Q., Zhong W., Sun X., Zhou Z. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling contributes to alcohol-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2016, vol. 40, no. 5, pp. 988–999. <https://doi.org/10.1111/acer.13049>
45. Liu S., Wu H.-J., Zhang Z.-Q., Chen Q., Liu B., Wu J.-P., Zhu L. The ameliorating effect of rosiglitazone on experimental nonalcoholic steatohepatitis is associated with regulating adiponectin receptor expression in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2011, vol. 650, no. 1, pp. 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.082>

46. Zhang F., Lu Y., Zheng S. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  cross-regulation of signaling events implicated in liver fibrogenesis. *Cellular Signalling*, 2012, vol. 24, no. 3, pp. 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.cell-sig.2011.11.008>

47. Pang M., de la Monte S. M., Longato, M. Tong, He J., Chaudhry R., Duan K., Ouh J., Wands J. R. PPAR $\delta$  agonist attenuates alcohol-induced hepatic insulin resistance and improves liver injury and repair. *Journal of Hepatology*, 2009, vol. 50, no. 6, pp. 1192–1201. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.021>

48. Khoo N. K. H., Hebbar S., Zhao W., Moore S. A., Domann F. E., Robbins M. E. Differential activation of catalase expression and activity by PPAR agonists: implications for astrocyte protection in anti-glioma therapy. *Redox Biology*, 2013, vol. 1, no. 1, pp. 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.006>

49. Liu X., Jang S. S., An Z., Song H., Kim W.-D., Yu J.-R., Park W.-Y. Fenofibrate decreases radiation sensitivity via peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -mediated superoxide dismutase induction in HeLa cells. *Radiation Oncology Journal*, 2012, vol. 30, no. 2, pp. 88–95. <https://doi.org/10.3857/roj.2012.30.2.88>

### Информация об авторах

Семененя Игорь Николаевич – д-р мед. наук, профессор, директор. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (Бульвар Ленинского комсомола, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [insemenenya@yandex.by](mailto:insemenenya@yandex.by)

Шляхтун Алексей Генрихович – заведующий лабораторией. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (Бульвар Ленинского комсомола, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [a.shlyachtun@gmail.com](mailto:a.shlyachtun@gmail.com)

Радута Елена Францевна – ст. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (Бульвар Ленинского комсомола, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [e.raduta@ibiochemistry.by](mailto:e.raduta@ibiochemistry.by)

### Information about the authors

Igor N. Semenenya – D. Sc. (Med.), Professor, Director. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, BLK, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [insemenenya@yandex.by](mailto:insemenenya@yandex.by)

Alexej H. Shlyachtun – Head of the Laboratory. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, BLK, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [a.shlyachtun@gmail.com](mailto:a.shlyachtun@gmail.com)

Helena F. Raduta – 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: [e.raduta@ibiochemistry.by](mailto:e.raduta@ibiochemistry.by)