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

ВЕСЦІ
НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2020. Том 17, № 4

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2020. Том 17, № 4

Журнал основан в 2004 г.
Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

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

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

Главный редактор

Николай Сергеевич Сердюченко –
Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

О. О. Руммо (*заместитель главного редактора*) – Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь
В. Г. Колосовская (*ведущий редактор журнала*)
Ф. И. Висмонт – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
М. А. Герасименко – Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, Минск, Республика Беларусь
С. В. Губкин – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Г. Л. Гуревич – Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Республика Беларусь
Ю. Е. Еременко – Республиканский научно-практический центр оториноларингологии, Минск, Республика Беларусь
С. Л. Кабак – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

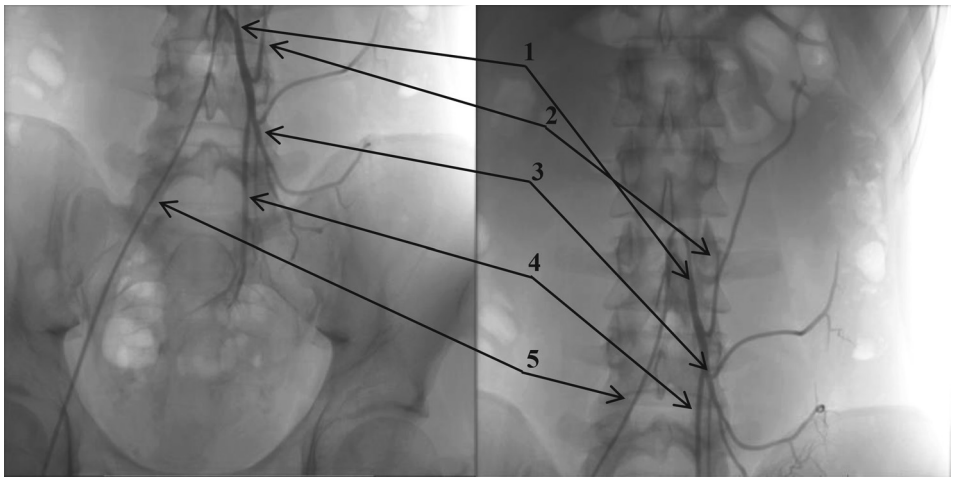


Рис. 2. Нижняя мезентерикография с последующим введением ММСК: *1* – нижняя брыжеечная артерия; *2* – левая ободочная артерия; *3* – сигмовидные артерии; *4* – верхняя прямокишечная артерия; *5* – интродьюсер

Fig. 2. Inferior mesentericography for transfusion of MMSC: *1* – inferior mesenteric artery; *2* – the left colon artery; *3* – sigmoid colon arteries; *4* – upper rectal artery; *5* – introducer

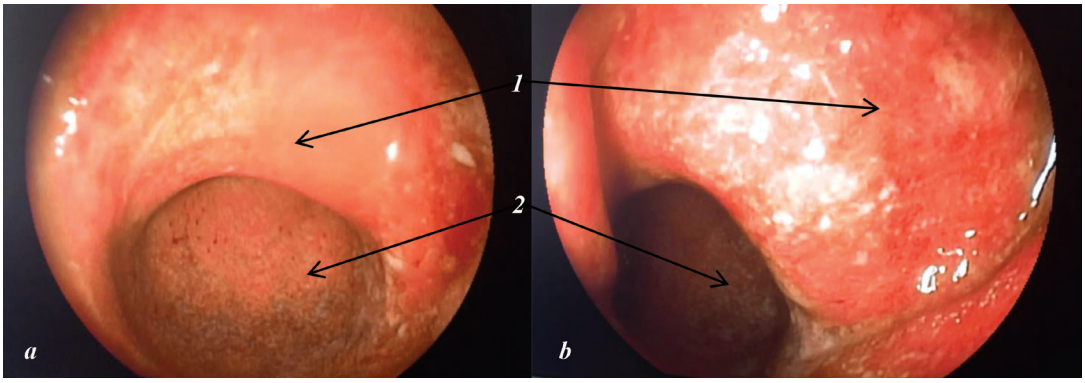


Рис. 3. Колоноскопия нижней трети сигмы (*a*) и прямой кишки (*b*): *1* – отечная и гиперемированная слизистая; *2* – «зернистость» слизистой

Fig. 3. Colonoscopy of the lower third of sigmoid colon (*a*) and the rectum (*b*): *1* – edematous and hyperemic mucosa; *2* – “granularity” of the mucosa

перистальтика сохранена. Симптомы раздражения брюшины отсутствовали. При лабораторном исследовании отмечено повышение С-РБ до 7 мг/л. Выполнена диагностическая колоноскопия № 17746/3: в прямой кишке и нижней трети сигмы просвет сохранен, слизистая отечна, гиперемированная, «зернистая», на стенках – слизь, сосудистый рисунок не визуализируется, отмечаются единичные контактные кровоизлияния. В остальных отделах – слизистая розовая, сосудистый рисунок сохранен. Заключение: хронический язвенный проктосигмоидит умеренной степени активности (рис. 3). Суммарный результат *DAI* составил 4 балла (активность болезни легкой степени) (табл. 3).

Таблица 3. **Индекс активности (*DAI*) язвенного колита от 14.05.2020**

Table 3. **Activity index of ulcerative colitis from 14.05.2020**

Показатель	*DAI*, баллы
Частота стула	1
Ректальное кровотечение	0
Эндоскопическая оценка слизистой	2
Врачебная оценка активности заболевания	1
Суммарный результат	4

Результаты и их обсуждение. Клеточная терапия на основе ММСК является наиболее перспективным методом лечения ЯК, что объясняется простотой культивирования и широким спектром дифференцировки указанной мезенхимальной фракции стволовых клеток. ММСК, полученные из красного костного мозга, гипоиммунны и не подвержены отторжению. Доказано, что их иммуномодулирующий и противовоспалительный эффекты оказывают как местное, так и системное действие. При попадании ММСК в область воспаления выделяются компоненты, ингибирующие продукцию факторов воспаления. Важным качеством этих клеток является усиление регенераторных процессов в очагах деструкции [5]. Имеются данные о положительных результатах клинических исследований, проведенных с 2010 по 2017 г. В двух из них инъекции ММСК проводили местно, в трех – путем внутривенной инфузии [6]. Таким образом, обосновано применение трансплантации культуры ММСК пациентам с формами ЯК, не поддающимися базовой терапии.

Применение аутологичного биологического материала в нашем клиническом наблюдении обусловлено достаточным техническим оснащением клиники, отсутствием в мировой литературе данных об убедительном преимуществе аллогенного материала над аутологичным и личным выбором пациента. Поскольку выбор метода введения стволовых клеток обусловлен необходимостью в первую очередь регионально воздействовать на очаг воспаления и повреждения слизистой, внутривенная инфузия не является приоритетной [7]. Подслизистые инъекции ММСК посредством колоноскопии способствуют большему повреждению воспаленной слизистой и не обеспечивают достаточное распределение клеток по всему пораженному участку. Введение же культуры стволовых клеток через брыжеечные артерии доказало свою эффективность и безопасность в экспериментах на животных и у пациентов в исследовательских центрах Китая [8, 9]. Выбор инфузии ММСК через НБА в нашем наблюдении был обусловлен локализацией патологии в левой половине толстой кишки, а также полученными в ходе выполнения рандомизированного

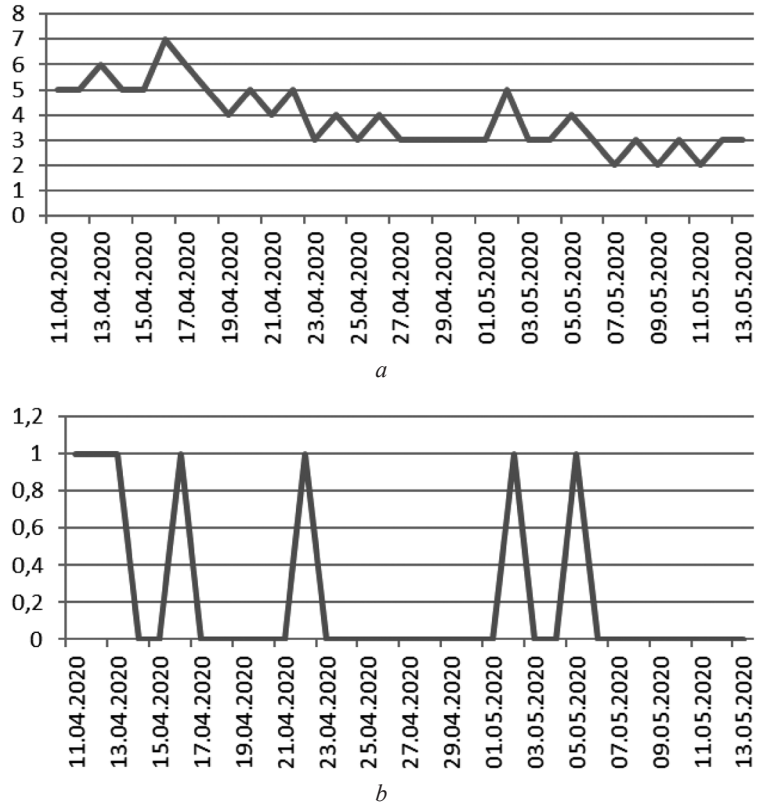


Рис. 4. Данные ежедневника в период с 11.04.2020 по 13.05.2020: *a* – частота стула (количество в сутки); *b* – наличие крови в стуле (0 – нет крови, 1 – незначительное количество крови в кале)

Fig. 4. Diary data from Apr 11, 2020 to May 13, 2020: *a* – stool frequency (amount per day); *b* – the presence of blood in the stool (0 – no blood, 1 – a small amount of blood in the stool)

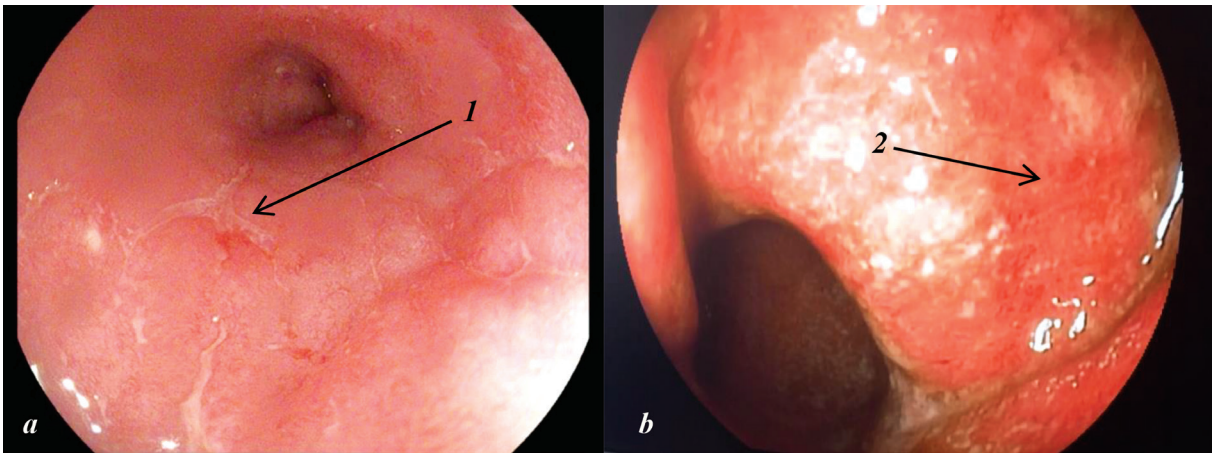


Рис. 5. Колоноскопия: *a* – до введения ММСК (от 31.03.2020); *b* – контрольная (от 14.05.2020) (*1* – изъязвления слизистой прямой кишки со спонтанными очагами кровотечения; *2* – отечная и гиперемированная слизистая прямой кишки, без изъязвления)

Fig. 5. Colonoscopy: *a* – before the introduction of MMSC (from 31.03.2020); *b* – control (from 14.05.2020) (*1* – ulceration of the rectal mucosa with spontaneous foci of bleeding;: *2* – edematous and hyperemic rectal mucosa, without ulceration)

экспериментального исследования на животных результатами. После проведенной клеточной терапии пациент был выписан 10.04.2020 в удовлетворительном состоянии на амбулаторное лечение. В течение последующего месяца он вел ежедневник.

Пациент Р. был вызван для лабораторно-инструментальной оценки результатов регионарной трансплантации ММСК через НБА на 43-и сутки после клеточной терапии. С его слов, частота стула составила до 3 раз в сутки, примесь крови отсутствовала, тенезмы не беспокоили. Общее состояние оценивалось пациентом как удовлетворительное. Проведен анализ данных ежедневника (рис. 4).

При лабораторном исследовании установлено повышение С-РБ до 12,9 мг/л. Другие результаты биохимического и общего анализов крови в диапазоне нормы или клинически незначимы. При выполнении контрольной диагностической колоноскопии изъязвления слизистой оболочки сигмы и прямой кишки отсутствовали, уменьшилась кровоточивость, но сохранились отечность и гиперемия (рис. 5).

Итоговый *DAI* язвенного колита на момент обследования составил 4 балла, что соответствует активности легкой степени (табл. 4).

Таблица 4. **Динамика индекса активности (*DAI*) язвенного колита за время наблюдения**

Table 4. **Dynamics of the activity index (*DAI*) of ulcerative colitis during the observation**

Показатель	*DAI*, баллы		
	19.12.2019	до введения ММСК (31.03.2020)	через 42 сут после введения ММСК (14.05.2020)
Частота стула	3	3	1
Ректальное кровотечение	1	1	0
Эндоскопическая оценка слизистой	3	3	2
Врачебная оценка активности заболевания	2	2	1
Суммарный результат	9	9	4

За время участия в программе проведена оценка качества жизни пациента по шкале *SF*-36 до введения ММСК и после (табл. 5). Его результаты отражают положительную динамику в пунктах – социальное функционирование, боль, общее самочувствие и динамика общего состояния. Высокий процент коррелирует с более благополучным состоянием здоровья.

Анализ литературы, содержащей отчеты, оценивающие эффективность и безопасность введения ММСК в ходе исследований, позволил выявить ряд возможных неблагоприятных последствий,

Таблица 5. **Динамика качества жизни пациента согласно анкетам *SF*-36 до и после лечения, %**

Table 5. **Dynamics of the quality of life of the patient according to the questionnaire *SF*-36 before and after treatment, %**

Позиция в *SF*-36	Качество жизни	
	до лечения (01.04.2020)	после лечения (14.05.2020)
Физическое функционирование	60	60
Энергия/усталость	65	65
Эмоциональное благополучие	72	72
Социальное функционирование	50	62,5
Боль	45	55
Общее самочувствие	35	50
Динамика общего состояния	50	75

таких как острая инфузионная реакция, лихорадка, осложнения со стороны органов и систем, инфекции различной степени тяжести и отдаленные последствия (злокачественные новообразования, смерть). Тем не менее их количество в сравнении с таковым в контрольных группах не отличалось или было незначимым, что может указывать на безопасность такой лечебной процедуры [10, 11]. На всех этапах проведения описанной системной клеточной терапии у пациента Р. осложнений или нежелательных явлений не отмечено, что может быть классифицировано по системе *Accordion* (2009) как класс 0. Наблюдение за пациентом продолжается.

Таким образом, лечение пациентов с язвенным колитом представляет собой в некоторых случаях трудную задачу. Это обусловлено недостаточной эффективностью консервативной терапии на основе препаратов 5-АСК и глюкокортикостероидов. Повышение дозировки последних коррелирует с возрастанием количества осложнений. Поэтому в описанном клиническом случае пациенту было предложено лечение аутологичными ММСК.

Выводы

1. Применение аутологичных ММСК у данного пациента снизило активность язвенного колита с тяжелой степени до легкой.

2. Участие в программе позволило отменить прием глюкокортикостероидов на стационарном этапе и далее не применять их на амбулаторном, не увеличивать дозу 5-АСК и не назначать для лечения азатиоприн.

3. Регионарное введение аутологичных ММСК посредством нижней мезентерикографии не выявило осложнений самой манипуляции и неблагоприятных последствий клеточной терапии.

4. Результатом лечения стала удовлетворенность пациента качеством жизни, что подтверждается данными ежедневника и анкет *SF*-36.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies / S. C. Ng [et al.] // Lancet. – 2017. – Vol. 390, N 10114. – P. 2769–2778. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)32448-0

2. Хронические воспалительные заболевания кишечника в Республике Беларусь / Ю. В. Горгун [и др.] // Лечеб. дело. – 2017. – № 3. – С. 5–12.

3. Looking for the best anti-colitis medicine: a comparative analysis of current and prospective compounds / A. A. Chumanevich [et al.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 228–237. https://doi.org/10.18632/oncotarget.13894

4. Mahadevan, U. Medical treatment of ulcerative colitis / U. Mahadevan // Clin. Colon Rectal Surg. – 2004. – Vol. 17, N 1. – P. 7–19.

5. Лазебник, Л. Б. Трансплантация аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга увеличивает продолжительность ремиссии и снижает риск развития рецидива язвенного колита / Л. Б. Лазебник [и др.] // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. – 2010. – № 3. – С. 5–10.

6. Mesenchymal stem cells for the treatment of ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis of experimental and clinical studies / X. Shi [et al.] // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – Vol. 10. – Art. 266. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1336-4

7. Комплексная противовоспалительная терапия острой атаки язвенного колита с применением мезенхимальных стволовых клеток костного мозга / О. В. Князев [и др.] // Доказательная гастроэнтерология. – 2013. – Т. 2, № 4. – С. 12–19.

8. Mesenteric injection of adipose-derived mesenchymal stem cells relieves experimentally-induced colitis in rats by regulating Th17/Treg cell balance / Z. Fu [et al.] // Am. J. Transl. Res. – 2018. – Vol. 10, N 1. – P. 54–66.

9. Safety and therapeutic effect of mesenchymal stem cell infusion on moderate to severe ulcerative colitis / J. Hu [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2016. – Vol. 12, N 5. – P. 2983–2989. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3724

10. Безопасность терапии воспалительных заболеваний кишечника с применением мезенхимальных стромальных клеток: результаты 5-летнего наблюдения / О. В. Князев [и др.] // Тер. архив. – 2015. – Т. 87, № 2. – С. 39–44.

11. Lalu, M. M. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (Safecell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials / M. M. Lalu // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, N 10. – P. e47559. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047559

References

1. Ng S. C., Shi H. Y., Hamidi N., Underwood F. E., Tang W., Benchimol E. I. [et al.]. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*, 2017, vol. 390, no. 10114, pp. 2769–2778. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)32448-0

2. Gorgun Ju. V., Borovnjova E. A., Stoljarova T. A., Jurkevich A. S., Zharskaja O. M., Vladimirova I. A., Saevich N. I. Chronic inflammatory bowel disease in the Republic of Belarus. *Lechebnoye delo* [Medical business], 2017, vol. 3, no. 55, pp. 5–12 (in Russian).

3. Chumanevich A. A., Chaparala A., Witalison E. E., Hossam T., Hofseth A. B., Lane C. [et al.]. Looking for the best anti-colitis medicine: a comparative analysis of current and prospective compounds. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 1, pp. 228–237. https://doi.org/10.18632/oncotarget.13894

4. Mahadevan U. Medical treatment of ulcerative colitis. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 2004, vol. 17, no. 1, pp. 7–19.

5. Lazebnik L. B., Knyazev O. V., Parfenov A. I., Ruchkina I. N., Rogozina V. A., Konoplyannikov A. G. Transplantation of allogeneic mesenchymal bone marrow stem cells increases the duration of remission and reduces the risk of ulcerative colitis. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya* [Experimental and clinical gastroenterology], 2010, vol. 3, pp. 5–10 (in Russian).

6. Shi X., Chen Q., Wang F. Mesenchymal stem cells for the treatment of ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis of experimental and clinical studies. *Stem Cell Research and Therapy*, 2019, vol. 10, art. 266. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1336-4

7. Knyazev O. V., Parfenov A. I., Ruchkina I. N., Konoplyannikov A. G., Shcherbakov P. L. Combined anti-inflammatory therapy of an acute attack of ulcerative colitis with the use of bone marrow mesenchymal stem cells. *Dokazatel'naya gastroenterologiya* [Evidence-based gastroenterology], 2013, vol. 2, no. 4, pp. 12–19 (in Russian).

8. Fu Z., Zhang Z., Ge H. Mesenteric injection of adipose-derived mesenchymal stem cells relieves experimentally-induced colitis in rats by regulating Th17/Treg cell balance. *American Journal of Translational Research*, 2018, vol. 10, no. 1, pp. 54–66.

9. Hu J., Zhao G., Zhang L., Qiao C., Di A., Gao H., Xu H. Safety and therapeutic effect of mesenchymal stem cell infusion on moderate to severe ulcerative colitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, vol. 12, no. 5, pp. 2983–2989. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3724

10. Knyazev O. V., Parfenov A. I., Konoplyannikov A. G., Ruchkina I. N., Churikova A. A., Bykova S. V., Albulova E. A., Boldyreva O. N., Fadeeva N. A., Lishchinskaya A. A. Safety of mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel deases: results of a 5-year follow-up. *Terapevticheskii arkhiv* [Therapeutic archive], 2015, vol. 87, no. 2, pp. 39–44 (in Russian).

11. Lalu M. M, Mclntyre L., Pugliese C., Fergusson D., Winston B. W., Marshall J. C., Granton J., Stewart D. J. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (Safecell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 10, p. e47559. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047559

Информация об авторах

Воробей Александр Владимирович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dept-surg@hotmail.com

Зафранская Марина Михайловна – д-р мед. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zafranskaya@gmail.com

Дыбов Олег Геннадьевич – аспирант. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: AlehDybau@protonmail.com

Information about the authors

Aliaksandr U. Varabei – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: deptsurg@hotmail.com

Marina M. Zafranskaya – D. Sc. (Med.), Assistant Professor, Chief Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zafranskaya@gmail.com

Aleh G. Dybau – Postgraduate student. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: AlehDybau@protonmail.com

Нижегородова Дарья Борисовна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nzh@tut.by

Лагодич Наталья Анатольевна – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Lagodich_2014@mail.ru

Старостин Андрей Михайлович – аспирант. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bio_star@mail.ru

Адамович Анна Юрьевна – мл. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anik_adamovich@mail.ru

Коростелев Дмитрий Юрьевич – рентгенэндоваскулярный хирург. Минская областная клиническая больница (а/г Лесной, 1, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: korostelevd@inbox.ru

Darya B. Nizheharodava – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor, Leading Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nzh@tut.by

Natallia A. Lahodzich – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Lagodich_2014@mail.ru

Andrej M. Starastsin – Postgraduate student. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bio_star@mail.ru

Hanna Yu. Adamovich – Junior Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anik_adamovich@mail.ru

Dmitry Yu. Korostelev – X-ray endovascular surgeon. Minsk Regional Clinical Hospital (1, a/g Lesnoy, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: korostelevd@inbox.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 611.711.6
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-401-408

Поступила в редакцию 21.04.202
Received 21.04.2020

С. Л. Кабак[1], В. В. Заточная[1], Н. О. Жижко-Михасевич[2]

[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
[2]Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, Минск, Республика Беларусь

ВРОЖДЕННЫЕ АНОМАЛИИ ПОЯСНИЧНО-КРЕСТЦОВОГО ОТДЕЛА ПОЗВОНОЧНИКА

Аннотация. Цель исследования – провести сравнительный анализ строения переходного пояснично-крестцового позвонка, выявляемого с помощью компьютерной томографии (КТ) и на анатомических препаратах, а также обсудить возможные патогенетические механизмы формирования этой аномалии развития. В статье представлено описание переходного пояснично-крестцового позвонка, в том числе 6 случаев сакрализации L5 и 3 случая люмбализации S1.

Формирование переходного пояснично-крестцового позвонка детерминировано генетически. Большинство типов подобной аномалии развития удается выявить только с помощью КТ. Сакрализация последнего поясничного позвонка повторяет процесс слияния крестцовых позвонков в единую кость. Напротив, нарушение конкресценции поперечно-реберных отростков закладки первых крестцовых позвонков как нормального процесса его морфогенеза имеет следствием люмбализацию S1.

Ключевые слова: крестец, переходный пояснично-крестцовый позвонок, сакрализация, люмбализация

Для цитирования: Кабак, С. Л. Врожденные аномалии пояснично-крестцового отдела позвоночника / С. Л. Кабак, В. В. Заточная, Н. О. Жижко-Михасевич // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 401–408. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-401-408

Sergei L. Kabak, Valentina V. Zatochnaya, Natalya O. Zhizhko-Mikhasevich

[1]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[2]Republican Scientific and Practical Centre for Traumatology and Orthopedics, Minsk, Republic of Belarus

CONGENITAL ANOMALIES OF THE LUMBOSACRAL SPINE

Abstract. The aim of the study is to compare the structure of the lumbosacral transitional vertebra, which were detected by computed tomography (CT) and identified on dried human sacral, and to discuss possible pathogenetic mechanisms of this congenital malformation. The article presents 9 cases of lumbosacral transitional vertebra, including 6 cases of L5 sacralization and 3 cases of S1 lumbarization.

The formation of the transitional lumbosacral vertebra is genetically determined. All types of such developmental anomaly can be detected only on CT. L5 sacralization repeats the process of fusion of the sacral vertebra into a single bone. A lack of the costotransverse bars of the first sacral vertebrae fusion results in the S1 lumbarization.

Keywords: sacrum, lumbosacral transitional vertebra, sacralization, lumbarization

For citation: Kabak S. L., Zatochnaya V. V., Zhizhko-Mikhasevich N. O. Congenital anomalies of the lumbosacral spine. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 401–408 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-401-408

Введение. В норме поясничный отдел позвоночного столба человека представлен пятью костями, которые соединены между собой связками, межпозвоночными дисками и дугоотростчатыми суставами. Крестец – кость треугольной формы, расположенная внизу позвоночного столба между тазовыми костями. Формирование единой костной структуры завершается во вторую декаду постнатального онтогенеза в результате окостенения межпозвоночных дисков, а также срастания дуг и отростков пяти крестцовых позвонков [1].

Пояснично-крестцовый отдел позвоночника является самым частым местом локализации аномалий развития [2, 3]. Спектр этих аномалий включает: дополнительное сочленение поперечных

© Кабак С. Л., Заточная В. В., Жижко-Михасевич Н. О., 2020

отростков пятого поясничного – первого крестцового позвонков; одностороннее (двухстороннее) слияние L5 и S1 или частичное (полное) разделение двух верхних крестцовых позвонков [4].

Описаны случаи, когда на костных анатомических препаратах выявляется одностороннее либо двухстороннее, частичное либо полное срастание тел, дуг и/или отростков последнего поясничного и первого крестцового позвонков [5–8]. Такой вариант строения часто называют сакрализацией поясничного позвонка. Вместе с тем N. K. Mahato [9] и R. G. Tague [10] используют этот термин только для случаев конкресценции или формирования неоартроза между поперечным отростком последнего поясничного позвонка и крестцовым крылом. Подобный вариант строения, по данным R. G. Tague [10], в коллекциях анатомических препаратов встречается с частотой 10,9 %. Клиницисты в случаях объединения L5 и S1 предпочитают использовать термин «переходный пояснично-крестцовый позвонок». Рентгенологически такой вариант строения может проявляться либо односторонней дисплазией поперечного отростка, который становится шириной более 19 мм (тип Ia по классификации A. E. Castellvi с соавт. [11]), либо полным двухсторонним слиянием поперечного отростка L5 с крестцом (тип IIIb). Частота встречаемости переходного поясничногрудного позвонка зависит от расы [6, 12, 13] и колеблется в диапазоне от 4 % в китайской популяции до 35,9 % у жителей Турции.

Частичное или полное разделение поперечных отростков, тел и дуг двух верхних крестцовых позвонков называется люмбализацией S1. Для определения степени выраженности этой аномалии развития, так же как и в случае с сакрализацией последнего поясничного позвонка, используют классификацию A. E. Castellvi [11].

Оба варианта переходного пояснично-крестцового позвонка встречаются с разной частотой. При ретроспективном анализе рентгеновских снимков 3607 взрослых людей D. Uçar с соавт. [14] диагностировали сакрализацию и люмбализацию в 17,2 и 1,7 % случаев соответственно. V. A. Sharma с соавт. [15] на выборке из 206 крестцов обнаружили переходный пояснично-крестцовый позвонок в 38 (18,4 %) случаях: сакрализацию – в 14,1 %, люмбализацию – в 4,3 % случаев.

Цель настоящего исследования – провести сравнительный анализ строения переходного пояснично-крестцового позвонка, выявляемого с помощью компьютерной томографии и на анатомических препаратах, а также обсудить возможные патогенетические механизмы формирования этой аномалии развития.

Материалы и методы исследования. Оба варианта переходного пояснично-крестцового позвонка (4 случая сакрализации L5 и 1 случай люмбализации S1) были выявлены у пациентов ГУ «РНПЦ травматологии и ортопедии», которым в период с марта по ноябрь 2019 г. проводилась рентгеновская компьютерная томография (КТ). Исследование проводили на аппарате Siemens Somatom Emotion 16, в спиральном режиме, при толщине среза 1,5 или 1 мм. В работе с пациентами и при подготовке публикации соблюдались этические принципы, предписанные Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki) пересмотра 2013 г.

Кроме того, было изучено 19 крестцов взрослых людей, не идентифицированных по полу и возрасту, из остеологической коллекции Белорусского государственного медицинского университета, среди которых были выявлены один случай сакрализации пятого поясничного позвонка и два случая уменьшения количества крестцовых позвонков.

Результаты исследования. На рис. 1 представлен Ia тип переходного позвонка по A. E. Castellvi. Поперечные отростки L5 аномально расширены в кранио-каудальном направлении (больше справа). Сочленение с крестцом и с подвздошной костью отсутствует. Дугоотростчатые суставы имеют признаки артроза, дуга последнего поясничного позвонка и крестец сегментированы.

При типе IIa переходного пояснично-крестцового позвонка по A. E. Castellvi (рис. 2, *A*) широкий поперечный отросток L5 слева образует неоартроз с крестцовым крылом и подвздошной костью. В области поперечно-крестцового сочленения имеются признаки дегенеративно-дистрофических изменений с вакуум-феноменом в проекции суставной щели. Отмечается неровность краев контактных поверхностей с небольшим краевым остеофитом по поверхности. В сегменте L4–L5 наблюдаются небольшое снижение высоты межпозвоночного диска и его незначительная дорсальная протрузия.

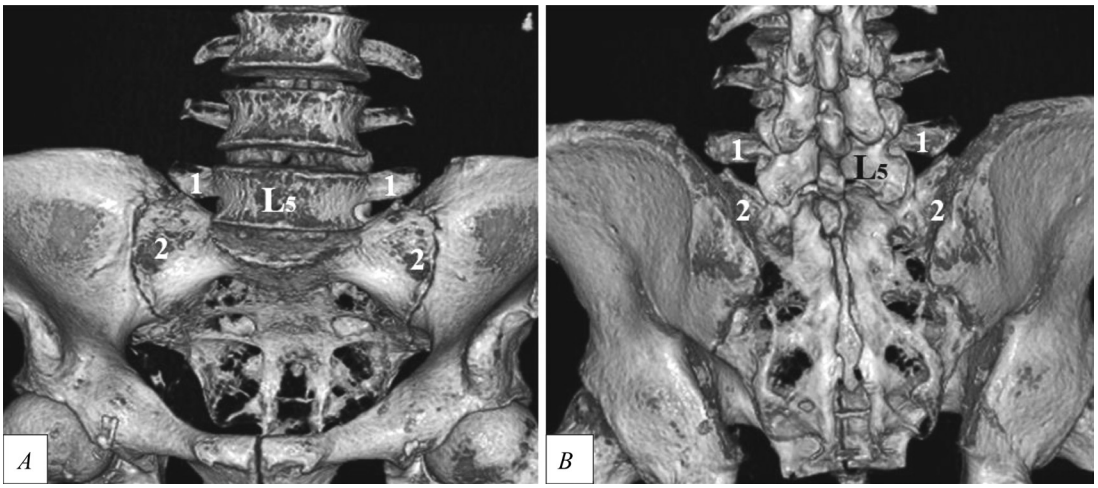


Рис. 1. Сакрализации L5 (тип Ia по Castellvi) у пациента М. (82 года): односторонняя дисплазия правого поперечного отростка последнего поясничного позвонка (*1* – поперечный отросток; *2* – крестцовое крыло; L5 – пятый поясничный позвонок). 3D-реконструкция пояснично-крестцового отдела позвоночника: *A* – вид спереди; *B* – вид сзади

Fig. 1. Sacralizations L5 (Castellvi type Ia) at patient M. (82 years old): unilateral dysplasia of the right transverse process of the last lumbar vertebra (*1* – transverse process; *2* – sacral wing; L5 – fifth lumbar vertebra). 3D-reconstruction of the lumbosacral spine: *A* – frontal view; *B* – back view

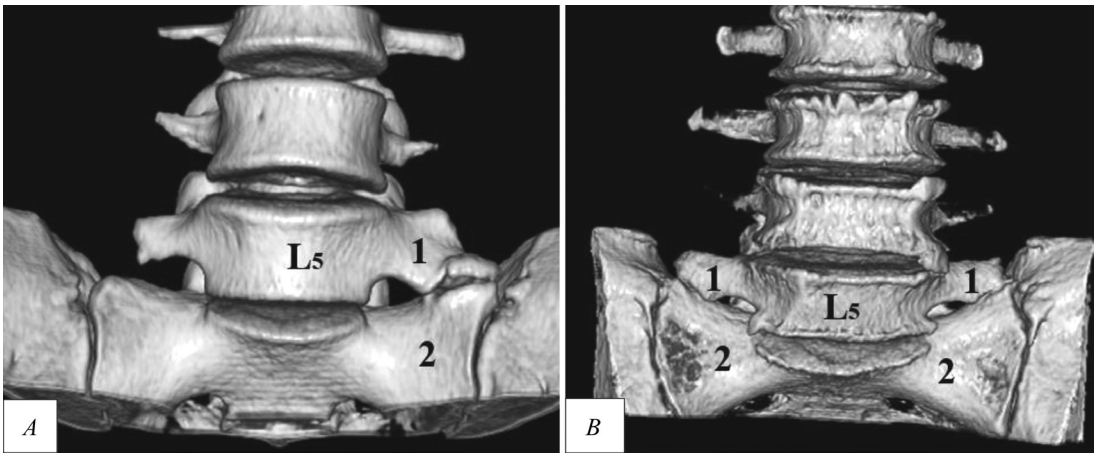


Рис. 2. Сакрализации L5 (тип II по Castellvi): у пациентки М. (31 год) тип IIa – неоартроз между левым поперечным отростком последнего поясничного позвонка и крестцовым крылом (*A*); у пациентки Л. (60 лет) тип IIb – двустороннее образование аномальных диартрозов поперечных отростков L5 с крестцом (*B*). *1* – поперечный отросток; *2* – крестцовое крыло; L5 – пятый поясничный позвонок. 3D-реконструкция пояснично-крестцового отдела позвоночника, вид спереди

Fig. 2. Sacralizations of L5 (Castellvi type II): at patient M. (31 years old) type IIa – neoarthrosis between the left transverse process of the last lumbar vertebra at a sacral wing (*A*); at patient L. (60 years old) type IIb – bilateral formation of abnormal diarthroses of L5 transverse processes with the sacrum (*B*). *1* – transverse process; *2* – sacral wing; L5 – fifth lumbar vertebra. 3D-reconstruction of the lumbosacral spine, frontal view

При IIb типе переходного позвонка по A. E. Castellvi (рис. 2, *B*) широкие поперечные отростки пятого поясничного позвонка образуют поперечно-крестцовые неоартрозы с крестцовым крылом с обеих сторон. В области неоартрозов выявлены признаки дегенеративно-дистрофических изменений. Имеется частичная оссификация подвздошно-поясничной связки с обеих сторон. Определяются умеренно выраженные дегенеративные изменения замыкательных пластинок L2–S1, а также визуализируются признаки остеохондроза, дугоотростчатого артроза на уровне вышележащих сегментов, протрузия межпозвоночных дисков, субхондральный склероз и краевые остеофиты на уровне L3–L4, L4–L5.

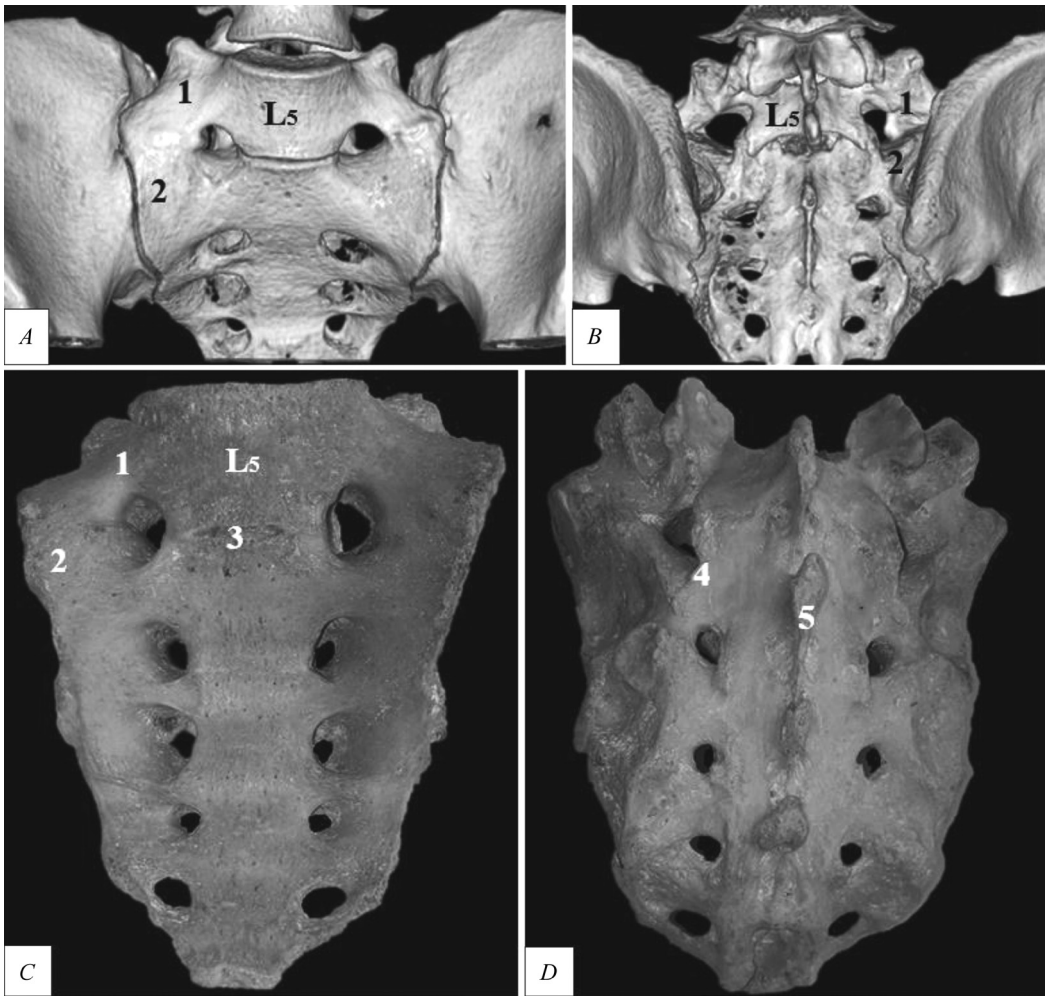


Рис. 3. Сакрализации L5 у пациентки Ш. (24 года): *A*, *B* – тип IIIb по Castellvi; *C*, *D* – анатомический препарат (*1* – поперечный отросток L5; *2* – крестцовое крыло; *3* – остаточное пространство; *4* – верхний суставной отросток L5; *5* – остистый отросток L5; L5 – пятый поясничный позвонок). 3D-реконструкция пояснично-крестцового отдела позвоночника: *A*, *C* – вид спереди; *B*, *D* – вид сзади

Fig. 3. Sacralization of L5 at patient Sh. (24 years old): *A*, *B* – Castellvi type IIIb; *C*, *D* – dried human sacrum (*1* – transverse process L5; *2* – sacral wing; *3* – residual space; *4* – superior articular process L5; *5* – spinous process L5; L5 – fifth lumbar vertebra). 3D-reconstruction of the lumbosacral spine: *A*, *C* – frontal view; *B*, *D* – back view)

На рис. 3 представлен IIIb тип переходного пояснично-крестцового позвонка по A. E. Castellvi. Расширенные поперечные отростки L5 с двух сторон сливаются с крестцовым крылом и сочленяются прерывно с подвздошными костями (рис. 3, *A*). Отмечается также гипоплазия L5–S1 межпозвоночного диска. В L5–S1 дугоотростчатых диартрозах суставах щель сужена, однако прослеживается на всем протяжении (рис. 3, *B*). Дуга пятого поясничного позвонка и крестец полностью сегментированы.

На рис. 3, *C*, *D* представлен костный препарат с ассимиляцией последнего поясничного позвонка крестцом. На границе между телами L5 и S1 позвонков сохраняется остаточное пространство. Вместе с тем суставы между этими позвонками анкилозированы, дуги синостозированы, а остистый отросток L5 входит в состав срединного крестцового гребня. На вентральной и дорсальной поверхности кости имеется по пять крестцовых отверстий.

На рис. 4, *A* приведен случай частичной люмбализации S1 позвонка. С левой стороны у первого крестцового позвонка имеется обособленный поперечный отросток, тогда как справа отросток входит в состав крестцового крыла и ограничивает сверху переднее крестцовое отверстие. Тела L5–S1, так же как и тела двух верхних крестцовых позвонков, формируют полный костный блок. Вместе с тем в дугоотростчатых суставах между S1 и S2 признаков анкилозирования

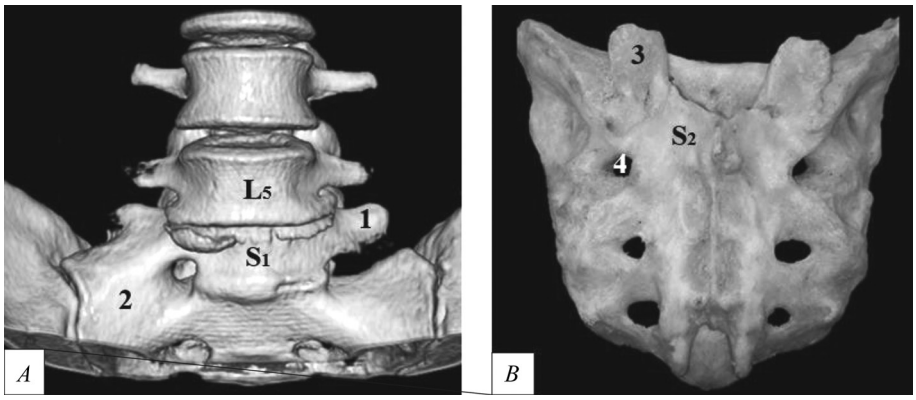


Рис. 4. Люмбализация S1 у пациентки К. (34 года): *A* – тип IIIa по Castellvi (поперечный отросток первого крестцового позвонка слева отделен от крестцового крыла; костный блок тел L5–S1; 3D-реконструкция пояснично-крестцового отдела позвоночника, вид спереди); *B* – крестец с тремя парами крестцовых отверстий (мацерированный костный препарат, вид спереди: *1* – поперечный отросток S1; *2* – крестцовое крыло; *3* – верхний суставной отросток S2; *4* – заднее крестцовое отверстие; L5 – последний поясничный позвонок; S1 – первый, S2 – второй крестцовый)

Fig. 4. S1 Lumbarization S1 at patient K. (34 years old): *A* – Castellvi type IIIa (the transverse process of the first sacral vertebra on the left is separated from the sacral wing; bony block of bodies L5-S1; 3D-reconstruction of the lumbosacral spine; frontal view); *B* – sacrum with three pairs of sacral foramina. Dried human sacrum; frontal view: *1* – transverse process S1; *2* – sacral wing; *3* – superior articular process S2; *4* – posterior sacral foramen; L5 – last lumbar vertebra; S1 – first, S2 – second sacral vertebra)

и дегенеративно-дистрофических изменений не наблюдается. В пояснично-крестцовой области выявлен спондилолизный спондилолистез L5, сопровождающийся дегенеративно-дистрофическими изменениями межпозвоночного диска. Эти изменения проявляются выраженным снижением высоты диска, субхондральным склерозом и краевыми остеофитами на телах позвонков. Выявленные патологические изменения носят не врожденный, а приобретенный характер.

В остеологической коллекции нами было обнаружено два крестца, имевших по три пары крестцовых отверстий на тазовой и вентральной поверхности (рис. 4, *B*). Согласно классификации A. E. Castellvi, подобная картина, характерна для типов I и II переходного пояснично-крестцового позвонка. Ввиду отсутствия соответствующего поясничного позвонка уточнить тип люмбализации не представлялось возможным.

Обсуждение. По данным литературы, переходный пояснично-крестцовый позвонок – врожденная аномалия развития, возникающая в результате неправильного формирования, миграции, дифференцировки, сегментации или ресегментации склеротомов сомитов [13, 16]. Глобальное структурирование осевого скелета млекопитающих и его нормальное развитие обеспечивают *Hox* гены [17]. У мутантных мышей без *HoxPG11* гена крестец отсутствует, а отдельные сегменты в этом отделе позвоночника выглядят как поясничные позвонки [18]. Такой фенотип напоминает люмбализацию последнего поясничного позвонка у человека. У трансгенных эмбрионов со сверхэкспрессией *Hox* гена (*Dll1–Hoxa11* трансгеник) наблюдается слияние поперечных отростков смежных поясничных позвонков, которое интерпретируется как фенотип «сакрализации» [19].

Другой потенциальной причиной сакрализации (в частности, срастания тел, суставных отростков и дуг позвонков) считается объединение вторичных центров оссификации смежных позвонков, которые появляются уже в постнатальном онтогенезе [6, 15, 16].

Развитие всех структурных компонентов позвоночного столба проходят три стадии: мезенхимную, хрящевую и костную. Хондрификация крестцовых позвонков начинается у 7-недельных зародышей человека [20]. При этом латеральная часть крестца представляет собой целостную хрящевую структуру, соединяющую нейральные дуги верхних крестцовых позвонков, которые у эмбрионов человека представляют собой обособленные закладки (рис. 5). Считается, что латеральные части крестца формируются за счет конкресценции реберно-поперечных отростков трех верхних крестцовых позвонков, образование которых в свою очередь является результатом слияния рудиментов ребра и поперечного отростка [21]. В процессе филогенеза имеют место редукция поперечного отростка поясничных позвонков и его слияние с ребром, но при этом реберно-

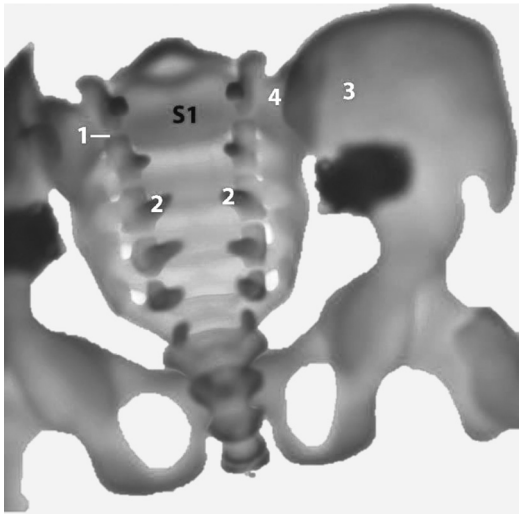


Рис. 5. Строение закладок крестцовых позвонков и тазовой кости 8-недельного зародыша человека (вид сзади): *1* – дугоотростчатое сочленение; *2* – две половины нейральной дуги; *3* – крыло подвздошной кости; *4* – латеральная часть крестца; S1 – закладка тела первого крестцового позвонка. Просветленный препарат, окрашенный альциановым синим и красным ализарином. ×10

Fig. 5. Structure of sacral vertebrae and hip bone anlages 8-weeks old embryo (back view): *1* – zygapophyseal joint; *2* – two halves of the neural arch; *3* – wing of Ilium; *4* – lateral part of sacrum; S1 – anlage of body of the first sacral vertebra. Whole-mount skeletal preparations, stained with alcian blue and alizarin red. ×10

поперечные отростки не сливаются между собой [22]. В связи с этим формирование переходного пояснично-крестцового позвонка IIIa и IIIb типов по A. E. Castellvi и образование латеральной части крестца на ранних стадиях эмбриогенеза, вероятнее всего, происходит сходным образом, детерминировано генетически и может быть визуализировано задолго до начала окостенения – уже на мезенхимной стадии гистогенеза. Подобным образом происходит полное или частичное слияние ребер или формирование блоков тел грудных/шейных позвонков при врожденных аномалиях развития.

Оссификация крестцовых позвонков стартует на 10–12-й неделе внутриутробного развития [23]. Сначала центры окостенения появляются в теле (один) и в нейральных отростках (два), а позднее – в области каждой латеральной части закладки крестца (по три дополнительных первичных центра окостенения) [24]. Подобно другим сегментам позвоночного столба на протяжении всего внутриутробного периода развития, а также в первые декады жизни тела дуги и суставные отростки крестцовых позвонков остаются обособленными. Синостозирование крестцовых позвонков, происходящее с возрастом, вероятнее всего, связано с их иммобилизацией за счет срастания реберно-поперечных отростков под воздействием механической нагрузки на крестец, обусловленной прямохождением человека. Этим обстоятельством можно объяснить разнообразие морфологических проявлений сакрализации последнего крестцового позвонка, выявляемое при рентгенологическом обследовании позвоночника у живого человека. При изучении мацерированных анатомических препаратов обнаруживается, как правило, только III тип переходного пояснично-крестцового позвонка, когда формируется костное сращение между смежными сегментами позвоночного столба.

Некоторые исследователи полагают, что пояснично-крестцовый позвонок образуется в результате нарушения формирования центров окостенения в эмбриональном периоде развития. При возникновении лишних точек окостенения происходит сакрализация, при недостатке таких точек – люмбализация [25]. Подобное объяснение выглядит малоубедительным, так как центры оссификации появляются внутри обособленных хрящевых моделей костей. Несколько таких центров могут сливаться между собой только в пределах одной закладки.

Заключение. Формирование переходного пояснично-крестцового позвонка детерминировано генетически. Большинство типов подобной аномалии развития можно выявить только с помощью КТ. Сакрализация последнего поясничного позвонка повторяет процесс слияния крестцовых позвонков в единую кость. Напротив, нарушение конкресценции поперечно-реберных отростков закладок первых крестцовых позвонков как нормального процесса его морфогенеза имеет следствием люмбализацию S1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Malformed vertebrae: a clinical and imaging review / A. Chaturvedi [et al.] // Insights into Imaging. – 2018. – Vol. 9, N 3. – P. 343–355. https://doi.org/10.1007/s13244-018-0598-1

2. Esses, S. E. Surgical anatomy and operative approaches to the sacrum / S. E. Esses, D. J. Botsford // The adult spine: principles and practice. – Philadelphia, 1997. – Vol. 2. – P. 2329–2341.

3. Cheng, J. S. Anatomy of the sacrum / J. S. Cheng, J. K. Song // Neurosurg. Focus. – 2003. – Vol. 15, N 2. – P. 1–4. https://doi.org/10.3171/foc.2003.15.2.3

4. Mahato, N. K. Transitional female sacrum: dimensions, alterations in dorsal pelvic structure, and potential obstetric implications / N. K. Mahato // Oman Med. J. – 2018. – Vol. 33, N 1. – P. 22–28. https://doi.org/10.5001/omj.2018.05

5. Khairnar, K. B. Sacralization of lumbar vertebra / K. B. Khairnar, M. B. Rajale // Indian J. Basic Appl. Med. Res. – 2013. – Vol. 6, N 2. – P. 510–514.

6. Shetty, A. S. Sacralization of fifth lumbar vertebra – a case report / A. S. Shetty, R. Jetti // Austin J. Anatomy. – 2017. – Vol. 4, N 2. – P. 1066–1067. https://doi.org/10.26420/austinjanat.2017.1066

7. Nikumbh, R. D. Morphological study of sacralisation of fifth lumbar vertebra and its clinical relevance / R. D. Nikumbh, A. N. Wanjari, D. B. Nikumbh // Indian J. Anat. – 2017. – Vol. 6, N 2. – P. 119–124. https://doi.org/10.21088/ija.2320.0022.6217.5

8. Bhasin, R. Sacralization of lumbar vertebrae-its anatomical, embryological and clinical perspective / R. Bhasin, S. Hamid, S. Raina // Global J. Res. Analys. – 2018. – Vol. 7, N 9. – P. 28–30.

9. Mahato, N. K. Complete sacralization of L5 vertebrae: traits, dimensions, and load bearing in the involved sacra / N. K. Mahato // Spine J. – 2010. – Vol. 10, N 7. – P. 610–615. https://doi.org/10.1016/j.spinee.2010.04.012

10. Tague, R. G. Sacralization is not associated with elongated cervical costal process and cervical rib / R. G. Tague // Clin. Anat. – 2011. – Vol. 24, N 2. – P. 209–217. https://doi.org/10.1002/ca.21087

11. Castellvi, A. E. Lumbosacral transitional vertebrae and their relationship with lumbar extradural defects / A. E. Castellvi, L. A. Goldstein, D. P. Chan // Spine. – 1984. – Vol. 9, N 5. – P. 493–495. https://doi.org/10.1097/00007632-198407000-00014

12. Wazir, S. Sacralisation of lumbar vertebrae / S. Wazir // Int. J. Anat. Res. – 2014. – Vol. 2, N 2. – P. 386–389.

13. Transverse sacralization of lumbar vertebrae: prevalence according to Castellvi classification / J. V. Patel [et al.] // Int. J. Res. Orthoped. – 2016. – Vol. 3, N 1. – P. 116. https://doi.org/10.18203/issn.2455-4510.intjresorthop20164835

14. Retrospective cohort study of the prevalence of lumbosacral transitional vertebra in a wide and well-represented population / D. Uçar [et al.] // Arthritis. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–5. https://doi.org/10.1155/2013/461425

15. Sharma, V. A. Oesteogenic study of lumbosacral transitional vertebra in central India region / V. A. Sharma, D. K. Sharma, C. K. Shukla // J. Anat. Soc. India. – 2011. – Vol. 60, N 2. – P. 212–217. https://doi.org/10.1016/s0003-2778(11)80030-4

16. Krishnamurthy, A. Study on incidence of sacralisation of fifth lumbar vertebra in South Indian population / A. Krishnamurthy, M. Adibatti // Ital. J. Anat. Embryol. – 2016. – Vol. 121, N 1. – P. 60–65.

17. Mallo, M. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan / M. Mallo, D. M. Wellik, J. Deschamps // Develop. Biol. – 2010. – Vol. 344, N 1. – P. 7–15. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.04.024

18. Wellik, D. M. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton / D. M. Wellik, M. R. Capecchi // Science. – 2003. – Vol. 301, N 5631. – P. 363–367. https://doi.org/10.1126/science.1085672

19. Hox genes specify vertebral types in the presomitic mesoderm / M. Carapuço [et al.] // Genes & Development. – 2005. – Vol. 19, N 18. – P. 2116–2121. https://doi.org/10.1101/gad.338705

20. Salsabili, N. Development of the human sacroiliac joint / N. Salsabili, D. A. Hogg // Clin. Anat. – 1991. – Vol. 4, N 2. – P. 99–108. https://doi.org/10.1002/ca.980040204

21. Steele, D. G. The anatomy and biology of the human skeleton / D. G. Steele, C. A. Bramblett. – Texas A&M Univ. Press, 1988. – 304 p.

22. Coalson, R. E. Musculoskeletal system / R. E. Coalson, J. J. Tomasek // Embryology. – N. Y., 1992. – P. 46–56.

23. Bakkum, B. W. Development of the spine and spinal cord / B. W. Bakkum, W. E. Bachop // Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and Ans / ed. : G. D. Cramer, S. A. Darby. – St. Louis, 2014. – P. 541–565.

24. Jain, A. Sacral-alar-iliac fixation in pediatric deformity: radiographic outcomes and complications / A. Jain, K. M. Kebaish, P. D. Sponseller // Spine Deformity. – 2016. – Vol. 4, N 3. – P. 225–229. https://doi.org/10.1016/j.jspd.2015.11.005

25. Макарова, А. В. Аномалии развития позвоночного столба [Электронный ресурс] / А. В. Макарова, А. Г. Сероух // Студенческий научный форум : VII Междунар. студент. эл. науч. конф., 15 февр.–31 марта 2015 г. – Режим доступа : http://www.scienceforum.ru/2015/898/11185. – Дата доступа : 04.10.2020.

References

1. Chaturvedi A., Klionsky N. B., Nadarajah U., Chaturvedi A., Meyers S. P. Malformed vertebrae: a clinical and imaging review. *Insights into Imaging*, 2018, vol. 9, no. 3, pp. 343–355. https://doi.org/10.1007/s13244-018-0598-1

2. Esses S. E., Botsford D. J. Surgical anatomy and operative approaches to the sacrum. *The adult spine: Principles and practice*. Philadelphia, 1997, vol. 2, pp. 2329–2341.

3. Cheng J. S., Song J. K. Anatomy of the sacrum. *Neurosurgical Focus*, 2003, vol. 15, no. 2, pp. 1–4. https://doi.org/10.3171/foc.2003.15.2.3

4. Mahato N. K. Transitional female sacrum: dimensions, alterations in dorsal pelvic structure, and potential obstetric implications. *Oman Medical Journal*, 2018, vol. 33, no. 1, p. 22–28. https://doi.org/10.5001/omj.2018.05

5. Khairnar K. B., Rajale M. B. Sacralization of lumbar vertebra. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research*, 2013, vol. 6, no. 2, pp. 510–514.

6. Shetty A. S., Jetti R. Sacralization of fifth lumbar vertebra – a case report. *Austin Journal of Anatomy*, 2017, vol. 4, no. 2, pp. 1066–1067. https://doi.org/10.26420/austinjanat.2017.1066

7. Nikumbh R. D., Wanjari A. N., Nikumbh D. B. Morphological study of sacralisation of fifth lumbar vertebra and its clinical relevance. *Indian Journal of Anatomy*, 2017, vol. 6, no. 2, pp. 119–124. https://doi.org/10.21088/ija.2320.0022.6217.5

8. Bhasin R., Hamid S., Raina S. Sacralization of lumbar vertebrae-its anatomical, embryological and clinical perspective. *Global Journal for Research Analysis*, 2018, vol. 7, no. 9, pp. 28–30.

9. Mahato N. K. Complete sacralization of L5 vertebrae: traits, dimensions, and load bearing in the involved sacra. *Spine Journal*, 2010, vol. 10, no. 7, pp. 610–615. https://doi.org/10.1016/j.spinee.2010.04.012

10. Tague R. G. Sacralization is not associated with elongated cervical costal process and cervical rib. *Clinical Anatomy*, 2011, vol. 24, no. 2, pp. 209–217. https://doi.org/10.1002/ca.21087

11. Castellvi A. E., Goldstein L. A., Chan D. P. Lumbosacral transitional vertebrae and their relationship with lumbar extradural defects. *Spine*, 1984, vol. 9, no. 5, pp. 493–495. https://doi.org/10.1097/00007632-198407000-00014

12. Wazir S. Sacralisation of lumbar vertebrae. *International Journal of Anatomy and Research*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 386–389.

13. Patel J. V., Mehta C. M., Patil N. G., Sehgal S. R. Transverse sacralization of lumbar vertebrae: prevalence according to Castellvi classification. *International Journal of Research in Orthopedics*, 2016, vol. 3, no. 1, p. 116. https://doi.org/10.18203/issn.2455-4510.intjresorthop20164835

14. Uçar D., Uçar B. Y., Coşar Y., Emrem K., Gümüşsuyu G., Mutlu S., Mutlu B., Çaçan M. A., Mertsoy Y., Gümüş H. Retrospective cohort study of the prevalence of lumbosacral transitional vertebra in a wide and well-represented population. *Arthritis*, 2013, vol. 2013, pp. 1–5. https://doi.org/10.1155/2013/461425

15. Sharma V. A., Sharma D. K., Shukla C. K. Oesteogenic study of lumbosacral transitional vertebra in central India region. *Journal of Anatomical Society of India*, 2011, vol. 60, no. 2, pp. 212–217. https://doi.org/10.1016/s0003-2778(11)80030-4

16. Krishnamurthy A., Adibatti M. Study on incidence of sacralisation of fifth lumbar vertebra in South Indian population. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 2016, vol. 121, no. 1, pp. 60–65.

17. Mallo M., Wellik D. M., Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Developmental Biology*, 2010, vol. 344, no. 1, pp. 7–15. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.04.024

18. Wellik D. M., Capecchi M. R. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science*, 2003, vol. 301, no. 5631, pp. 363–367. https://doi.org/10.1126/science.1085672

19. Carapuço M., Nóvoa A., Bobola N., Mallo M. Hox genes specify vertebral types in the presomitic mesoderm. *Genes and Development*, 2005, vol. 19, no. 18, pp. 2116–2121. https://doi.org/10.1101/gad.338705

20. Salsabili N., Hogg D. A. Development of the human sacroiliac joint. *Clinical Anatomy*, 1991, vol. 4, no. 2, pp. 99–108. https://doi.org/10.1002/ca.980040204

21. Steele D. G., Bramblett C. A. *The anatomy and biology of the human skeleton*. Texas A&M University Press, 1988. 304 p.

22. Coalson R. E., Tomasek J. J. Musculoskeletal System. *Embryology*. New York, 1992, pp. 46–56.

23. Bakkum B. W., Bachop W. E. Development of the spine and spinal cord. *Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and Ans*. St. Louis, 2014, pp. 541–565.

24. Jain A., Kebaish K. M., Sponseller P. D. Sacral-alar-iliac fixation in pediatric deformity: radiographic outcomes and complications. *Spine Deformity*, 2016, vol. 4, no. 3, pp. 225–229. https://doi.org/10.1016/j.jspd.2015.11.005

25. Makarova A. V., Seroukh A. G. Anomalies of development of vertebral colums. *Studencheskii nauchnyi forum : VII Mezhdunarodnaya studencheskaya elektronnaya nauchnaya konferentsiya, 15 fevralya–31 marta 2015 goda* [Student scientific forum: VII International student electronic scientific conference, February 15–March 31, 2015]. Available at: http://www.scienceforum.ru/2015/898/11185 (accessed 04.10.2020) (in Russian).

Информация об авторах

Кабак Сергей Львович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kabakmorph@gmail.com

Заточная Валентина Владимировна – ст. преподаватель. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: v.zatochnaya@gmail.com

Жижко-Михасевич Наталья Олеговна – врач-рентгенолог. Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии (ул. Кижеватова, 60/4, 220024, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nataliamikhasevich@rambler.ru

Information about the authors

Sergei L. Kabak – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kabakmorph@gmail.com

Valentina V. Zatochnaya – Senior Lecturer. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v.zatochnaya@gmail.com

Natalya O. Zhizhko-Mikhasevich – Radiologist. Republican Scientific and Practical Centre for Traumatology and Orthopedics (60/4, Kizhevatov Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nataliamikhasevich@rambler.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
UDC 616.36:616–099–092.4:612.441:661.722
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-409-416 Received 06.04.2020

Valeria V. Lobanova, Frantishek I. Vismont

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

INTERACTION OF LIVER ARGINASE AND L-ARGININE-NO SYSTEM IN THE PROCESSES OF DETOXIFICATION, LIPID PEROXIDATION AND THE FORMATION OF THE THYROID STATUS IN RATS WITH CHRONIC ETHANOL INTOXICATION

Abstract. A sufficient number of facts testifying the importance of liver arginase and nitrogen monoxide in the life processes in the normal and pathological conditions have been accumulated to date.

The aim of the study was to determine the significance of the relationship and interaction of liver arginase and L-arginine-NO system in the processes of detoxification, lipid peroxidation and the formation of the thyroid status in rats with chronic ethanol intoxication.

In rat experiments using the modern physiological, biochemical research methods and a pharmacological approach, it was found that chronic ethanol intoxication leads to a decrease in the liver arginase activity and the triiodothyronine concentration. At the same time, the increase in the level of "average molecules", NO_3^-/NO_2^-, the content of lipid peroxidation products in the plasma, as well as the increase in the blood toxicity degree, the activity of alanine amino transferase, aspartate amino transferase and the narcotic sleep duration were observed. Hyperthyroid rats demonstrated the increased liver arginase activity, the processes of detoxification, lipid peroxidation and body temperature while rats with the experimental hypothyroidism showed the opposite results. The liver arginase depression caused by the injection of N^{ω}-hydroxy-nor-L-arginine (Nor-NOHA), or L-valine into the body prevents the body temperature increase and the development of characteristic changes in the detoxification and lipid peroxidation processes acted upon by exogenous triiodothyronine. Under the conditions of the liver arginase inhibition by Nor-NOHA or L-valine, the ethanol action is accompanied by a more significant inhibition of the liver detoxification function and an increase of NO_3^-/NO_2^- levels in blood plasma. The preliminary injection of an N^G-nitro-L-arginine methyl ester inhibitor of NO-synthase into the animal's body weakens the toxic ethanol effect on the liver, as well as the development of characteristic changes in the liver arginase activity, in the processes of detoxification and lipid peroxidation in rats with chronic ethanol intoxication.

Apparently, the activity of liver arginase and L-arginine-NO system determines the severity of detoxification, lipid peroxidation processes and the formation of the thyroid status in the conditions of chronic alcoholization, which is important in the ethanol intoxication pathogenesis.

Keywords: chronic ethanol intoxication, detoxification, liver arginase, lipid peroxidation, L-arginine-NO system, rats

For citation: Lobanova V. V., Vismont F. I. Interaction of liver arginase and L-arginine-NO system in the processes of detoxification, lipid peroxidation and the formation of the thyroid status in rats with chronic ethanol intoxication. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 409–416. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-409-416

В. В. Лобанова, Ф. И. Висмонт

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АРГИНАЗЫ И L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ, РАЗВИТИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И ФОРМИРОВАНИЯ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭТАНОЛОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Аннотация. К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о том, что аргиназа печени и монооксид азота играют значительную роль в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии.

Целью исследования было выяснение значимости взаимосвязи и взаимодействия аргиназы и L-аргинин-NO системы печени в процессах детоксикации, развития оксидативного стресса и формировании тиреоидного статуса у крыс при хронической этаноловой интоксикации.

В опытах на крысах с использованием современных физиологических, биохимических методов исследования и фармакологического подхода было установлено, что хроническая этаноловая интоксикация приводит к снижению активности аргиназы печени, концентрации трийодтиронина и к повышению уровня «средних молекул», NO_3^-/NO_2^-, содержания продуктов ПОЛ в плазме, степени токсичности крови, активности аланинаминотрансферразы и аспартатаминотрансферразы, продолжительности наркотического сна. У гипертиреоидных крыс повышается, а у крыс

© Lobanova V. V., Vismont F. I., 2020

с экспериментальным гипотиреозом снижается активность аргиназы печени, процессов детоксикации, ПОЛ и температура тела. Депрессия аргиназы печени, вызываемая введением в организм N^{ω}-гидрокси-нор-L-аргинином (Nor-NOHA), а также L-валина, препятствует повышению температуры тела и развитию характерных изменений процессов детоксикации и ПОЛ на действие экзогенного трийодтиронина. В условиях угнетения аргиназы печени как Nor-NOHA, так и L-валином действие этанола сопровождается более значимым угнетением детоксикационной функции печени и повышением содержания NO_3^-/NO_2^- в плазме крови. Предварительное введение в организм животным ингибитора NO-синтазы метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина ослабляет токсический эффект этанола на печень, а также развитие характерных изменений активности аргиназы печени, процессов детоксикации и ПОЛ у крыс с хронической этаноловой интоксикацией.

По-видимому, от активности аргиназы и L-аргинин-NO системы печени зависит выраженность процессов детоксикации, ПОЛ и формирование тиреоидного статуса в условиях хронической алкоголизации, что играет значимую роль в патогенезе этаноловой интоксикации.

Ключевые слова: хроническая этаноловая интоксикация, детоксикация, аргиназа печени, перекисное окисление липидов, L-аргинин-NO система, крысы

Для цитирования: Лобанова, В. В. Взаимодействие аргиназы и L-аргинин-NO системы печени в процессах детоксикации, развития оксидативного стресса и формирования тиреоидного статуса у крыс при хронической этаноловой интоксикации / В. В. Лобанова, Ф. И. Висмонт // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 409–416 (*на англ.*). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-409-416

Introduction. Modern medicine faces the problem of the steady growth of alcohol pathology leading to a reduction in life expectancy and adversely affecting the state of health.

It is known that morbidity and mortality in case of regular consumption of alcohol is associated with the toxic effects of ethanol on the most important human organs, and especially on the liver [1, 2]. In the mechanisms of the protective reactions development in conditions accompanied by toxinemia, the activity of the liver detoxification function and the pituitary-thyroid system are important [3, 4].

Numerous experimental data indicate that toxic ethanol metabolites, activation of LPO processes, and the development of oxidative stress make a significant contribution to liver damage caused by ethanol [1, 5, 6].

Currently, a sufficient number of facts indicating the importance of liver arginase in the processes of detoxification and vital functions of the body in normal and pathological conditions has accumulated [7–9]. It has been shown that the activity of the metabolism of iodine-containing thyroid hormones [10], that play an important role in detoxification processes, depends on the liver functional state [3].

A number of researchers found that a change in the blood level of thyroid hormones is closely correlated with the production of nitrogen monoxide (NO) in the body [4] and arginase activity is important for its formation [11]. Considering that liver arginase activity limits the availability of L-arginine for inducible NO synthase [11, 12], it was reasoned that its activity will affect NO synthesis, that plays an important role in detoxification mechanisms, lipid peroxidation, and thermoregulation [13, 14]. However, the participation of liver arginase and L-arginine-NO system, the significance of their interaction in the regulation of its detoxification function, LPO processes and the formation of thyroid status in rats during chronic alcohol intoxication was not the subject of a special comprehensive study.

The aim of this study was to determine the significance of the relationship and interaction of liver arginase and L-arginine-NO system in the detoxification processes, the development of oxidative stress and the formation of thyroid status in rats with chronic ethanol intoxication.

Materials and research methods. The study was conducted on non-narcotic adult white male rats weighing 180–220 g.

The experiments were carried out at a strictly defined time (8–12 hours in the morning). The ration of rats consisted of the feed KK-92/PHC-5, the amount of which was determined by the Norms of feeding laboratory animals [15]. Drinking mode adhered to the ad libitum principle.

Due to the fact that in the literature there is evidence that animals have significant fluctuations in the level of a number of hormones and biogenic amines in the blood during the day, which are accompanied by changes in energy and plastic metabolism, the experiments were carried out at a strictly defined time (8–12 hours in the morning).

An experimental model of chronic ethanol intoxication was reproduced in rats by daily intragastric injection of 30 % ethanol solution to animals (based on 3.5 g of 92 % ethanol per kg of body weight) for 60 days. Acute toxic liver damage was caused by the intragastric injection of a solution of carbon

tetrachloride (CCl_4) prepared using olive oil at a ratio of 1:1 at a rate of 5 ml/kg to the animals. The activity of liver arginase was determined spectrophotometrically [16]. The production of nitric monoxide (NO) was evaluated by the total level of nitrates/nitrites (NO_3^-/NO_2) in blood plasma [17]. The detoxification function of the liver and the degree of endogenous intoxication were evaluated by the degree of blood toxicity (DBT), the duration of narcotic sleep (DNS), as well as by the concentration of "medium molecules" (MM) in the blood plasma. DNS (injection of hexenal at a dose of 100 mg/kg intraperitoneally) was evaluated by the time the animals were in the side position [18]. The method of acid-ethanol deposition [19] was used to determine the content of MM in the blood, and DBT was evaluated by the method proposed by O. A. Radkova et al. [20]. The severity of liver damage was estimated by the activity of aspartate aminotransferase (AsAT) and alanine aminotransferase (AlAT) in the blood serum. The determination of the AsAT and AlAT activity in blood plasma was carried out using the colorimetric dinitrophenylhydrazine method.

The activity of lipid peroxidation in the blood and liver was evaluated by the content of such products as malondialdehyde (MDA), diene conjugates (DC), Schiff bases (SB). The concentration of MDA, DC, and SB was determined by the spectrophotometric method of M. Mihára, M. Uchiyama [21], V. A. Kostyuk [22] and B. L. Fletcher et al. [23], respectively.

Hypothyroidism in animals was reproduced using thyriostostatic mercazolilum (Ukrmedpreparaty, Ukraine), that was injected to rats daily intragastrically at a dose of 25 mg/kg on 1 % starch solution for 20 days. Experimental hyperthyroidism was reproduced using a synthetic preparation of triiodothyronine hydrochloride (Liothyronin, Berlin Chemie, Germany), that was injected intragastrally daily to animals at a dose of 30 μg/kg on 1 % starch solution for 20 days. The plasma level of triiodothyronine (T_3) and tetraiodothyronine (T_4) was determined by the radioimmunoassay using the test kits of OCP IBOKh NAS of Belarus. To determine the significance of liver arginase and NO in detoxification, thermoregulation and thyroid status formation, the arginase inhibitor N^{ω}-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) (Bachem AG, Germany) and also L-valine (Carl Roth GmbH + Co.KG, Germany) and a non-selective inhibitor of NO synthase – methyl ester N^G-nitro-L-arginine (L-NAME) (ACROS ORGANICS, USA). Nor-NOHA at a dose of 10 mg/kg was injected to rats intraperitoneally daily for 7 days, and L-valine was injected intraperitoneally at a dose of 100 mg/kg 30 min before the start of the experiment. L-NAME at a dose of 25 mg/kg was injected to rats once intraperitoneally. Rectal temperature was measured with a TPEM-1 medical electrothermometer.

Blood and liver tissue for studies were taken for the minimum possible time after animal decapitation, that was carried out one hour after the last injection of ethanol (in the experimental group) or physiological solution (in the control group).

All experiments were carried out in accordance with the ethical standards for the handling of laboratory animals, as well as the requirements of the Directive of the European Ethics Committee 86/609 / EEC of 11.24.1986 [24] and the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used in Experiments and Other Scientific Purposes" dated March 18, 1986 and TCH 125-2008 "Good laboratory practice" approved by the resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus No. 56 dated March 28, 2008 [25].

The received data were processed statistically using the software packages "Statsoft (USA) Statistica 8.0", "Microsoft Office Excell 2000", "Graph Pad Prism4". An analysis of the differences between the two independent groups by quantitative indicators, the distribution of which was not statistically significantly different from the normal, was carried out using the Student *t*-test in Welch's modification. Data for quantitative indicators are presented as arithmetic mean and standard error of the mean ($\overline{X} \pm S_x$), for qualitative indicators as percent. The differences between the experimental groups were considered significant at $p < 0.05$.

The results of the study. In experiments on rats, it was found that intragastric daily injection of 30 % aqueous ethanol solution to animals for 60 days leads to significant changes in arginase activity and liver detoxification function, body temperature, levels of lipid peroxidation products, NO_3^-/NO_2^-, tri- and tetraiodothyronine and plasma transaminase activity.

It was found that prolonged intragastric injection of ethanol leads to inhibition of the detoxification function of the liver, which was manifested by an increase in the level of MM in blood plasma –

by 38.5 % ($p < 0.05$, $n = 10$), DBT by 57.8 % ($p < 0$ 05, $n = 10$) and an increase in PNS by 24.5 % ($p < 0.05$, $n = 7$). The content of MM in blood plasma, DBT and DNS in the control group (with daily intragastric injection of a physiological solution for two months, $n = 10$) was 0.69 ± 0.012 g/l, 1.3 ± 0.11 units, respectively, and 27.8 ± 3.22 min. The liver arginase activity under the same conditions decreased by 54.7 % ($p < 0.05$, $n = 8$) and was 2.5 ± 0.27 μmol of urea/g of crude tissue per hour. The AsAT and AlAT activity as the most important indicators of the severity of liver damage, in the blood of alcoholized animals in comparison with the corresponding control increased by 196.3 % ($p < 0.05$, $n = 8$) and 488.5 % ($p < 0.05$, $n = 8$) and amounted to 1.77 ± 0.16 and 2.71 ± 0.13 μkat/l, respectively.

It was found that the effect of ethanol in the body of animals over 60 days is accompanied by an increase in blood plasma levels of DC, MDA and SB by 39.3 % ($p < 0.05$, $n = 7$), 58.5 % ($p < 0.05$, $n = 8$) and 50.8 % ($p < 0.05$, $n = 7$), respectively. The content of DC in the liver increased by 29.3 % ($p < 0.05$, $n = 7$), MDA by 36.5 % ($p < 0.05$, $n = 7$) and SB by 23.3 % ($p < 0.05$, $n = 7$). In rats of the control group (saline solution intragastrally daily for 60 days, $n = 8$), the content of DC, MDA, and SB in the blood plasma was 0.59 ± 0.051 D_{233}/ml, 0.71 ± 0.058 μmol/ml and 5.4 ± 0.52 IU/ml, and in the liver 14.5 ± 1.38 D_{233}/g tissue, 17.1 ± 0.71 μmol/g of tissue and 136.4 ± 13.5 U/g of tissue.

It was revealed that under conditions of chronic ethanol intoxication in animals, the concentration of NO_3^-/NO_2^- – end products of NO degradation in the blood plasma changes [11, 16]. Intragastric injection of ethanol after 60 days of alcoholization in rats ($n = 8$) resulted in an increase in plasma levels of NO_3^-/NO_2^- by 79.1 % ($p < 0.01$) and which amounted to 11.02 ± 1.34 μmol/l.

It was found that changes in thyroid status in rats occur as a result of chronic alcoholization. Prolonged (for 60 days) daily intragastric injection of 30 % ethanol solution led to a 58.8 % ($p < 0.05$, $n = 8$) decrease o fT_3 concentration in blood plasma. At the same time, T_4 concentration in comparison with the control group (daily intragastric injection of a physiological solution for 60 days) did not significantly change. The concentration of T_4 and T_3 in blood plasma in animals in the control group ($n = 7$) was 71.1 ± 11.04 and 1.7 ± 0.2 nMol/l, respectively.

It was found that 20 days after the daily intragastric injection of triiodothyronine hydrochloride (30 mg/kg), detoxification processes in animals are activated, liver arginase activity increases (by 41.0 %, $p < 0.05$, $n = 7$) and body temperature rises (by 0.7 °C, $p < 0.05$, $n = 8$). The DNS in rats under these conditions decreased by 27.2 % ($p < 0.05$, $n = 7$) and amounted to 20.9 ± 2.3 min. The content of MM in the blood plasma decreased by 23.5 % ($p < 0.05$, $n = 7$), and the degree of its toxicity decreased by 19.2 % ($p < 0.05$, $n = 7$). In this case, the plasma concentration of T_3 increased from 1.2 ± 0.1 to 1.9 ± 0.2 nMol/l (by 58.3 %, $p < 0.05$, $n = 8$) and T_4 decreased from 44, 7 ± 3.1 to 17.2 ± 2.0 nMol/l (by 61.5 %, $p < 0.05$, $n = 8$).

Depression of the functional activity of the thyroid gland with mercazolyl led to a decrease in liver arginase activity (by 25.6 %, $p < 0.05$, $n = 7$), inhibition of detoxification processes and a decrease in body temperature. So, before the injection of mercazolate, the rectal temperature in the rats of the experimental group ($n = 10$) was 37.3 ± 0.10 °C, and after 20 days of its use decreased by 0.9 °C ($p < 0.05$). The concentration of T_3 and T_4 in blood plasma in hypothyroid rats, compared with the control group (intragastric administration of 1 % starch solution for 20 days) decreased by 2.5 times ($p < 0.05$) and 3.2 times ($p < 0.05$) and amounted, respectively, to 0.54 ± 0.07 nMol/l ($n = 7$) and 16.4 ± 1.05 nMol/l ($n = 7$). The DNS in rats under these conditions increased by 28.2% ($p < 0.05$, $n = 7$) and amounted to 31.6 ± 2.85 min. The content of MM in the blood plasma of hypothyroid rats increased by 17.4 % ($p < 0.05$, $n = 7$), and DBT increased by 14.1 % ($p < 0.05$, $n = 6$).

It was revealed that in conditions of $CC1_4$ liver damage in rats, detoxification processes are inhibited, body temperature, liver arginase activity and plasma concentration of T_3 and T_4 decrease. So, 12 and 24 hours after the $CC1_4$ oil solution was injected into the stomach, the rectal temperature decreased, respectively, by 1.2 ± 0.12 °C ($p < 0.05$, $n = 12$) and by 1.7 ± 0.13 °C ($p < 0.05$, $n = 10$). The activity of liver arginase in rats ($n = 7$) under these conditions (in relation to animals in the control) decreased by 47.2 % ($p < 0.05$) and 61.8 % ($p < 0.05$), respectively, and the content NO_3^-/NO_2^- increased by 31.5 % ($p < 0.01$) and 58.4 % ($p < 0.01$), respectively. The activity of liver arginase in rats of the control groups (12 and 24 hours after intragastric injection of 1% starch solution) was 3.6 ± 0.30 ($n = 7$) and 3.8 ± 0.33 ($n = 7$) μmol of urea, respectively/g crude tissue per hour.

Acute toxic liver damage by CCl_4 led to an increase in plasma levels of MM and DBT. The concentration of MM after 12 and 24 hours from the time of seeding of animals CCl_4 increased by 28.2 % ($p < 0.05$, $n = 7$) and 39.1 % ($p < 0.05$, $n = 7$). Under these conditions, the DBT was higher in experimental rats compared to that in the control by 48.1 % ($p < 0.05$, $n = 6$) and 70.1 % ($p < 0.05$, $n = 7$). DNS in rats after 12 and 24 hours of CCl_4 injection increased compared to animals that received sunflower oil intragastricaly by 22.3 % ($p < 0.05$, $n = 8$) and 25.8 % ($p < 0.05$, $n = 9$), respectively. The duration of narcotic sleep in animals ($n = 7$) in the control group (12 and 24 hours after the injection of sunflower oil at a dose of 5.0 ml/kg into the stomach) was 22.8 ± 2.16 and 27.0 ± 1.73 min, respectively.

It was found that the action of CCl_4 in the animal organism is accompanied by the activation of lipid peroxidation processes in the blood and liver. So, 24 hours after the injection of CCl_4 oil solution into the stomach, the level of DC, MDA, and SB increased in blood plasma by 22.3 % ($p < 0.05$, $n = 7$), 32.2 % ($p < 0.05$, $n = 7$) and 81.4 % ($p < 0.05$, $n = 7$). In the liver, the content of DC increased by 20.5 % ($p < 0.05$, $n = 7$), MDA by 36.0 % ($p < 0.05$, $n = 7$), OR by 50.6 % ($p < 0.05$, $n = 7$). The action of CCl_4 in rats ($n = 8$) was accompanied by a decrease in the level of iodine-containing thyroid hormones in the blood plasma. So, 24 hours after the injection of hepatotropic poison to animals, a decrease in plasma levels of T_3 was observed – by 43.0 % ($p < 0.05$) and T_4 by 62.7 % ($p < 0.05$) compared with the control (intragastric injection of sunflower oil). The activity of AlAT and AsAT in blood after 12 and 24 hours after a single injection of CCl_4 oil solution (5.0 ml/kg) increased in experimental animals (compared with the corresponding control, intragastric injection of sunflower oil), respectively, by 518.5 % ($p < 0.05$) and 839.4 % ($p < 0.05$, $n = 6$), 136.7 % ($p < 0.05$, $n = 7$) and 204.5 % ($p < 0.05$, $n = 6$).

The results of the studies suggested that changes in body temperature and detoxification processes in rats under conditions of toxic liver damage as well as the depression of liver arginase and the L-arginine-NO system are mostly due to changes in the concentration of triiodothyronine in the blood plasma, which largely determines the activity of thermogenesis and detoxification processes.

It was found that daily intraperitoneal injection of the arginase inhibitor N^{ω}-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) from BAChEM (Germany) to rats at a dose of 10 mg/kg [26] as well as a single intraperitoneal injection of the arginase inhibitor L-valine [27] at a dose of 100 mg/kg did not statistically significantly affect body temperature and led to a decrease in liver arginase activity by 70.8 and 78.6 % ($p < 0.05$, $n = 7$), respectively. In animals of the control group ($n = 7$), that received an intraperitoneal saline solution for a week, the activity of liver arginase was 5.7 ± 0.51 μM mol of urea/g of crude tissue per hour, respectively.

Under conditions of liver arginase depression by nor-NOHA, the action of ethanol is accompanied by a more significant inhibition of the liver detoxification function, an increase in plasma NO_3^-/NO_2^- level, the content of lipid peroxidation products in the blood and liver, and a decrease in body temperature. The body temperature in rats influenced by chronic ethanol intoxication decreased by 1.2 ± 0.16 ($p < 0.01$, $n = 12$), and under the conditions of action of nor-NOHA by 1.6 ± 0.13 °C ($p < 0, 05$, $n = 8$). The content of NO_3^-/NO_2^-, DC and MDA in blood plasma in rats with chronic alcohol intoxication ($n = 8$) that got nor-NOHA compared to the level in the control group of animals (alcoholization and intraperitoneal injection of saline solution, $n = 8$) was higher by 47.1 % ($p < 0.05$), 35.1 % ($p < 0.05$) and 29.8 % ($p < 0.05$), respectively.

Acute toxic liver damage, 12 and 24 hours after the intragastric injection of CCl_4 was accompanied by a more significant decrease in body temperature and a significant increase in DNS toxicity of plasma and the level of MM in it in animals ($n = 7$), that were injected intraperitoneally with L-valine (100 mg/kg) daily for 7 days. Thus, the body temperature in rats of the control group, that were preliminarily injected intraperitoneally with physiological saline solution during the week before the intragastric injection of CCl_4 oily solution, decreased by 1.2 °C after 12 and 24 hours from the moment of hepatotropic poison injection ($p < 0.05$, $n = 10$) and 1.5 °C ($p < 0.05$, $n = 8$), and in the experiment, under conditions of preliminary intraperitoneal injection of L-valine, 12 hours and a day after the introduction of CCl_4, decreased by 1.7 °C ($p < 0.05$, $n = 7$) and 2.0 °C ($p < 0.05$, $n = 7$), respectively.

It was revealed that the action of CCl_4 in rats under conditions of liver arginase depression by L-valine is accompanied not only by a more significant inhibition of liver detoxification function, but also by more pronounced changes in the activity of AlAT and AsAT in animal blood plasma. It was also found

that the action of CCl_4 in the body, under the conditions of preliminary administration of L-valine to animals during the week, does not cause a decrease in T_4 level and exacerbates a decrease in T_3 concentration in blood plasma.

It was found that the effect of CCl_4 in animals that previously received L-NAME was accompanied by a less pronounced change in liver detoxification function. So, 24 hours after the injection of CCl_4, in conditions of depression of NO synthase by L-NAME, the content in the blood plasma of SM was lower by 22.3 % ($p < 0.05$, $n = 8$), and its toxicity decreased by 17.6 % ($p < 0.05$, $n = 8$) compared with the corresponding control (action only CCl_4). PNS in rats that received CCl_4 under L-NAME exposure conditions decreased by 29.0 % ($p < 0.05$, $n = 10$) after 24 hours intragastric injection of hepatotropic poison. It was found that the infusion of CCl_4, 24 hours after injection, in rats (previously treated intraperitoneally with L-NAME) leads to a more significant decrease in plasma T_3 concentration (by 23.1 %, $p < 0.05$, $n = 7$) and to a less pronounced (compared with animals that were injected with saline intraperitoneally and CCl_4 solution intragastrically) increase in the activity of AlAT and AsAT in blood plasma – by 26.7 % ($p < 0.05$, $n = 8$) and 24.0 % ($p < 0.05$, $n = 7$). Therefore, there was reason to believe that the thyroid status of the organism and the activity of detoxification processes depend not only on functional state of the pituitary-thyroid gland system, but also on the activity of arginase and L-arginine-NO of the liver system.

To verify the validity of our assumption, it was of interest to find out how the body temperature and activity of detoxification processes on the action of exogenous T_3 will change under conditions of L-arginine-NO system depression in animals.

The experiments showed that preliminary (12 hours before the intragastric injection of T_3) intraperitoneal administration to rats ($n = 8$) of L-valine (100 mg/kg) prevents the increase in body temperature induced by daily injection of T_3 (30 μg/kg) for 20 days.

In a special series of studies, it was found that the injection of exogenous T_3 to rats ($n = 8$) under conditions of action of an NO synthase inhibitor in the body (L-NAME, 25 mg/kg, intraperitoneally 30 min before the injection of triiodothyronine hydrochloride) does not lead to activation of detoxification processes and increase in body temperature. In the control group of animals (received saline instead of L-NAME, $n = 8$), an increase in body temperature was observed upon injection of T_3. Thus, an intragastric injection of triiodothyronine hydrochloride (30 μg/kg) to rats for 20 days, 30 min before the T_3 injection, who received an intraperitoneal saline solution, led to an increase in the rectal temperature of 0.8 °C in animals ($p < 0.05$, $n = 8$), and under the action of L-NAME (25 mg/kg), the action of T_3 in animals ($n = 8$) did not cause significant changes in body temperature.

DNS (hexenal 100 mg/kg intraperitoneally) in rats of the experimental group that received T_3 for 20 days under conditions of inhibition of the activity of NO synthase L-NAME increased 12 hours after the last intragastric injection of the hormone by 28.7 % ($p < 0.05$, $n = 7$) compared with control animals. The duration of narcotic sleep in control rats (intragastric injection of T_3 at a dose of 30 μg/kg for 20 days and saline intraperitoneally 30 min before injection of the hormone) was 20.4 ± 2.51 min ($n = 7$).

Along with an increase in DNS, hyperthyroid rats that preliminarily got L-NAME also showed an increase of MM plasma level up to 22.7 % ($p < 0.05$, $n = 7$) compared with animals in the control group. In experimental rats compared with those in the control DBT was higher by 24.3 % ($p < 0.05$, $n = 6$).

Therefore, under the conditions of action of the NO synthase inhibitor L-NAME in the body, triiodothyronine does not exert its characteristic activating effect on the processes of detoxification and thermogenesis.

It was found that the action of ethanol in rats, under conditions of preliminary (30 min before intragastrical injection of ethanol to animals for 60 days) injection of L-NAME into animals, as compared with the control group of animals, leads to less pronounced inhibition of detoxification processes. PNS, the level of SM in blood plasma and STK in experimental rats influenced by chronic alcoholization compared with animals of the control group (intraperitoneal injection of saline solution and chronic alcoholization, $n = 8$) were lower by 27.1 % ($p < 0.05$, $n = 9$), 48.3 % ($p < 0.05$, $n = 8$) and 24.2 % ($p < 0.05$, $n = 8$), respectively. The AlAT and AsAT activity in blood plasma in rats influenced by chronic alcoholization under conditions of action of an NO synthase inhibitor in animals was lower by 37.5 % ($p < 0.05$, $n = 7$) and 48, respectively 8 % ($p < 0.05$, $n = 7$), and the content of NO_3^-/NO_2^- by 39.1 % ($p < 0.05$, $n = 7$).

It was revealed that chronic ethanol intoxication in rats (n = 9) that previously received L-NAME, compared with animals of the control group, leads to a less significant increase in DC levels, namely, a decrease of DC level in the liver by 39.2 % ($p < 0.05$), and in blood plasma by 28.6 % ($p < 0.05$). The concentration of MDA in the liver under these conditions decreased by 27.6 % ($p < 0.05$), in plasma by 30.3 % ($p < 0.05$). The level of OS decreased in the liver and in blood plasma, respectively, by 50.5 % ($p < 0.05$) and 36.7 % ($p < 0.05$).

The revealed features of changes in the liver detoxification function and lipid peroxidation processes in the blood and liver, as well as the level of NO_3^-/NO_2^- in the blood plasma during chronic alcohol intoxication both in conditions of depression of liver arginase and the activity of the L-arginine-NO system, suggested that the activity of liver arginase and L-arginine-NO system determine the severity of detoxification processes and oxidative stress in chronic alcohol intoxication.

Conclusion. Chronic ethanol intoxication in rats is accompanied by a decrease in body temperature, blood T_3 level, liver arginase activity, an increase in DNS and in the content of lipid peroxidation products, levels of NO_3^-/NO_2^-, MM, DBT, as well as the activity of AlAT and AsAT in blood plasma. Liver arginase and the L-arginine-NO system are involved in changes in the detoxification function of the liver, lipid peroxidation processes, the thyroid status of the body, and body temperature induced by chronic ethanol intoxication. The action of the NO-synthase blocker L-NAME in the body weakens, but the arginase inhibitor nor-NOHA promotes the development of characteristic changes in the detoxification function of the liver and body temperature in chronic alcohol intoxication.

Thus, the results of our studies suggest that the activity of liver arginase and L-arginine-NO system determines the severity of detoxification processes, oxidative stress and the formation of thyroid status in conditions of chronic alcoholization, which is important in the pathogenesis of ethanol intoxication.

Conflicts of interests. The authors declare no conflict of interests.

References

1. Buko V. U., Lukivskaya O. Ya., Khokha A. M. *Metabolic effects of alcohol intoxication*. Minsk, Belorusskaya nauka Publ., 2005. 208 p. (in Russian).

2. Lelevich S. V., Barkovskii E. V. Central and peripheral metabolic mechanisms of chronic alcohol intoxication. *Narkologiya* [Narcology], 2013, no. 7, pp. 50–56.

3. Vismont F. I., Artyushkevich S. A. On the role of Kupffer cells and hepatocytes in the mechanisms of implementation of triiodothyronine influence on the processes of detoxification and regulation of body temperature. *Meditsinskii zhurnal* [Medical journal], 2005, no. 3, pp. 45–47 (in Russian).

4. Fernandez V., Cornejo P., Tapia G., Videla L. A. Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. *Nitric Oxide*, 1997, vol. 1, no. 6, pp. 463–468. https://doi.org/10.1006/niox.1997.0149

5. Moncada C., Torres V., Varghese G., Albano E., Israel Y. Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms. *Molecular Pharmacology*, 1994, vol. 46, no. 4, pp. 786–791.

6. Tapiv G., Pepper I., Smok G., Videla L. A. Kupffer cells function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Radical Research*, 1997, vol. 26, no. 3, pp. 267–279. https://doi.org/10.3109/10715769709097805

7. Vismont A. F., Lobanok L. M. The role of arginase in liver detoxification process and its participation in the mechanisms of regulation of body temperature with bacterial endotoxemia. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2011, vol. 55, no. 2, pp. 83–87 (in Russian).

8. Méndez J. D., De Haro H., Conejo V. A. Spermine inereases arginase activity in the liver after carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Long-Evans rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2006, vol. 6, no. 2, pp. 82–85. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.09.003

9. Proskuryakova T. V., Gurtovenko V. M., Trapeznikova S. S., Navasardyants D. I. Effect of alcohol intoxication on the activity of ethanol oxidation enzymes and rat liver arginase. *Voprosy meditsinskoi khimii* [Problems of medical chemistry], 1983, vol. 29, no. 4, pp. 95–98 (in Russian).

10. Greg Kelly N. D. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Alternativ Medical Review*, 2000, vol. 5, no. 4, pp. 306–333.

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

12. Hallemeesch M. M., Lamers W. H., Deutz N. E. Reduced arginine avaliability and nitric oxide production. *Clinical Nutrition*, 2002, vol. 21, no. 4, pp. 273–279. https://doi.org/10.1054/clnu.2002.0571

13. Teylor B. S., Alarson L. Ch., Billiar T. R. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc.)*, 1998, vol. 63, no. 7, pp. 766–781.

14. Gerstberger R. Nitric oxide and body temperature control. *Physiology*, 1999, vol. 14, no. 2, pp. 30–36. https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1999.14.1.30

15. *On the norms of feeding laboratory animals and producers: Order of the USSR Ministry of Health, March 10, 1966, No 163.* Avialable at: http:// http://www.libussr.ru/doc_ussr/usr_6382.htm (accessed 01.04.2012).

16. Geyer J. W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 1971, vol. 39, no. 2, pp. 412–417. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90431-3

17. Moshage H., Kok B., Huizenga J. R., Jansen P. L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clinical Chemistry*, 1995, vol. 41, no. 6, pp. 892–896. https://doi.org/10.1093/clinchem/41.6.892

18. Park D. V. *The biochemistry of foreign compounds*. Long Island City, Pergamon, 1968. 282 p.

19. Moin V. M., Nikolaychik V. V., Kirkovskiy V. V. The method for determining the group of substances of middle molecules in biological fluids. A. s. 1520445 SSSR, VRB F 01 no. 33/50. *Otkrytiya. Izobreteniya* [Discoveries. Inventions], 1987, no. 41. 415 p. (in Russian).

20. Rad'kova O. A., Boyarinov G. A., Balishina I. N. A method for determining the toxicity of biological fluids. A. s. 1146570 SSSR, MKI b Ol no. 1/28. *Otkrytiya. Izobreteniya* [Discoveries. Inventions], 1985, no. 11. 616 p. (in Russian).

21. Mihara M., Uchiyama T. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 1978, vol. 86, no. 1, pp. 271–278. https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1

22. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Lunets E. F. Spectrophotometric determination of diene conjugates. *Voprosy meditsinskoi khimii* [Problems of medical chemistry], 1984, no. 4, pp. 125–127 (in Russian).

23. Fletcher B. L., Dillard C. L., Tappel A. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Analytical Biochemistry*, 1973, vol. 52, no. 1, pp. 1–9. https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90327-8

24. *Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes*. Avialable at: http://www.eur-lex.europa.eu (accessed 21.05.2012).

25. *Technical Code of Good Practice 125-2008.Good Laboratory Practice, approved by the Republic of Belarus Ministry of Health decree № 56 from 28.03.2008*. Minsk, 2008. 35 p. (in Russian).

26. Boucher J. L. Selective inhibitors and substrates for arginases and nitric oxide syntheses. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2004, vol. 18, no. 1, pp. 5–15.

27. Lerzynski G., Suschek C. V., Kolb-Bachoten V. In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle. *Nitric Oxide*, 2006, vol. 14, no. 4, pp. 300–308. https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.11.009

Information about the authors

Valeria V. Lobanova – Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.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

Информация об авторах

Лобанова Валерия Валерьевна – ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by

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

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 617-089.844+57.086.833.4:616.22-007.271(047.31)(476)
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-417-426

Поступила в редакцию 12.06.2020
Received 12.06.2020

Н. Г. Антоневич[1], А. Е. Гончаров[1], В. Л. Чекан[2], Э. А. Шулепова[2], Е. Г. Рында[1]

[1]Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

ТЕРАПИЯ ХРОНИЧЕСКИХ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ И ГОРТАНИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ДВУХЛЕТНЕГО НАБЛЮДЕНИЯ

Аннотация. Хронические стенозы гортани и трахеи (ХСГТ) являются тяжелым патологическим состоянием, которое приводит к сужению дыхательных путей вследствие повреждения слизистой оболочки и формирования патофизиологических механизмов регенерации. Перспективным биомедицинским клеточным продуктом для лечения ХСГТ являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые, как известно, способны подавлять воспалительную реакцию и стимулировать регенерацию тканей.

Цель данного исследования – оценка безопасности, переносимости и отдаленной клинической эффективности клеточной терапии ХСГТ с использованием аутологичных МСК обонятельной выстилки (ОВ). В клиническое исследование были включены пациенты с диагнозом ХСГТ (J38.6 и J95.5 по МКБ-10) без нарушения целостности хрящевого каркаса с наличием или без наличия трахеостомы/ларингостомы, в том числе после хирургических вмешательств по восстановлению просвета гортани и трахеи.

Клиническое исследование метода лечения ХСГТ с использованием аутологичных МСК ОВ показало безопасность и хорошую переносимость клеточной терапии, позволило предотвратить рестенозирование и формирование рубцово-грануляционной ткани в течение 2 лет наблюдения у всех пациентов, включенных в исследование (n = 7). Восстановление площади просвета гортани и трахеи, улучшение функции дыхания и повышение толерантности к физической нагрузке отмечено у 6 пациентов, у которых отсутствовало нарушение хрящевого каркаса. Полученные данные свидетельствуют о высокой клинической эффективности метода клеточной терапии ХСГТ с использованием аутологичных МСК ОВ.

Ключевые слова: хронические стенозы гортани и трахеи, клеточная терапия, биомедицинский клеточный продукт, мезенхимальные стволовые клетки, обонятельная выстилка

Для цитирования: Терапия хронических стенозов трахеи и гортани мезенхимальными стволовыми клетками: результаты двухлетнего наблюдения / Н. Г. Антоневич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 417–426. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-417-426

Natalia G. Antonevich[1], Andrei Y. Hancharou[1], Valery L. Chekan[2], Elvira A. Shulepova[2], Alena H. Rynda[1]

[1]Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

THERAPY OF CHRONIC STENOSIS OF LARYNGOTRACHEAL STENOSIS WITH THE USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS: TWO-YEAR OBSERVATION RESULTS

Abstract. Laryngotracheal stenosis is a serious pathological process that leads to the narrowing of the airways because of damage of the mucous membrane and the formation of pathophysiological mechanisms of regeneration. Mesenchymal stem cells (MSCs) are known to be able to suppress the inflammatory response and to stimulate tissue regeneration; that is why, they are a promising biomedical cell product for treatment of laryngotracheal stenosis.

The aim of this study was to evaluate the safety, tolerability, and long-term clinical efficacy of cell therapy of laryngotracheal stenosis using autologous MSCs of the olfactory lining (OL). The clinical study included patients with a diagnosis of laryngotracheal stenosis (J38.6 and J95.5 according to ICD-10) without compromising the integrity of the cartilage frame with or without a tracheostomy/laryngostomy, including patients after surgical interventions to restore the lumen of the larynx and trachea.

Clinical trials of laryngotracheal stenosis using autologous olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells were carried out. Cell therapy was safe and well tolerated, and prevented the restenosis and formation of scar granulation tissue during 2 years of observation in all patients included in the clinical study. The restoration of the larynx and trachea lumen, the improved respiratory function and the increased exercise tolerance were observed in 6 patients who had no cartilage disorder. The data obtained indicate the high clinical efficacy of the method of cell therapy of laryngotracheal stenosis using autologous olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells.

Keywords: chronic laryngeal stenosis, cell therapy, biomedical cell product, mesenchymal stem cells, olfactory mucosa

For citation: Antonevich N. G., Hancharou A. Y., Chekan V. L., Shulepova E. A., Rynda A. H. Therapy of chronic stenosis of laryngotracheal stenosis with the use of mesenchymal stem cells: two-year observation results. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 417–426 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-417-426

Введение. Хронический стеноз гортани и трахеи (ХСГТ) достаточно редкое, но тяжелое заболевание, обусловленное сужением дыхательных путей, причинами которого наиболее часто (почти в 90 % случаев) являются медицинские вмешательства, такие как трахеостомия, интубация, длительная искусственная вентиляция легких. Повреждение слизистой оболочки, возникающее вследствие этих медицинских манипуляций, инициирует локальное воспаление, которое может приводить к нарушению естественного процесса эпителизации, формированию патофизиологических механизмов регенерации, которые способствуют избыточному росту незрелой грануляционной ткани, вызывающему сужение просвета трахеи и гортани [1]. Так, в одних участках слизистой оболочки наблюдаются явления альтерации, фибринозного воспаления, в других – развитие грануляционной ткани, в третьих – формирование продуктивного воспаления с развитием фиброза и частичной репарацией слизистой. Причиной этого может быть неполноценность созревающей соединительной ткани, которая постоянно подвергается структурным и метаболическим изменениям, способствующим развитию хронического воспаления [2]. Стеноз дыхательных путей (гортани и/или трахеи) вызывает хроническую гипоксию, что в конечном счете приводит к развитию сердечно-легочной недостаточности. Также необходимо отметить высокую восприимчивость таких пациентов к инфекционным заболеваниям.

Традиционное лечение ХСГТ комплексное, включая различные виды хирургических вмешательств. В зависимости от показаний проводят либо резекцию суженных участков дыхательных путей с последующим формированием анастомозов, либо поэтапное реконструктивно-восстановительное лечение с применением различных по конструкции стентов [3]. Несмотря на то что предпочтительным является радикальный подход с использованием резекционных методик, существует ряд ограничений, не позволяющих применять их к пациентам с ларинготрахеальными стенозами. Следует отметить, что в случае поэтапного реконструирования невозможно использовать один и тот же подход для всех пациентов. В зависимости от протяженности и характера стеноза индивидуально подбираются тип стента, длительность стентирования, сроки наблюдения после извлечения стента, размеры ларинготрахеостом и методы их пластического закрытия. Длительность лечения может варьироваться от нескольких месяцев до нескольких лет [4].

Основной проблемой восстановления просвета гортани и трахеи является рестенозирование с формированием хронических рубцово-грануляционных стенозов, что значительно снижает итоговую эффективность оперативного лечения данной категории пациентов и повышает стоимость лечения [2].

Таким образом, ХСГТ является тяжелым патологическим состоянием, которое значительно снижает качество жизни и требует длительного этапного лечения, в том числе и повторных хирургических вмешательств, а эффективность лечения зависит от того, удастся ли разорвать порочный круг рестенозирования в каждом отдельном случае. Добиться этого можно путем подавления местного воспаления и восстановления тканевого гомеостаза, что впоследствии обеспечит нормальную эпителизацию и регенерацию барьера слизистой оболочки. Перспективным биомедицинским клеточным продуктом (БМКП) для лечения ХСГТ являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые, как известно, способны подавлять воспалительную реакцию и стимулировать регенерацию тканей. Так, установлено, что МСК проявляют комплексный протекторный, трофический и иммуномодулирующий эффекты в отношении различных типов клеток, что позволяет снизить интенсивность местного воспалительного процесса при стенозах и обеспечить нормализацию процессов эпителизации ткани [5, 6]. Нами ранее показано, что *in vitro* МСК обонятельной выстилки (МСК ОВ) подавляют митоген-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов, цитотоксическую активность естественных киллерных клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, стимулируют формирование регуляторного фенотипа у дендритных клеток, В-клеток, макрофагов [7–10].

Обонятельная выстилка – один из наиболее доступных тканевых источников МСК ввиду простоты и безопасности забора тканевого материала из носовых ходов. Преимуществом МСК ОВ как основы БМКП является высокая пролиферативная активность клеток, а благодаря оптимизированным условиям производства БМКП на основе МСК ОВ в короткие сроки возможно накопление терапевтически значимого количества клеточной биомассы для одного пациента [11, 12].

Цель исследования – оценить безопасность, переносимость и отдаленную клиническую эффективность клеточной терапии хронического стеноза гортани и трахеи с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки.

Материалы и методы исследования. *Отбор пациентов.* В клиническое исследование были включены пациенты с диагнозом ХСГТ (J38.6 и J95.5 по МКБ-10) без нарушения целостности хрящевого каркаса ($n = 6$), с наличием или без наличия трахеостомы/ларингостомы, в том числе после хирургических вмешательств по восстановлению просвета гортани и трахеи (программа клинических исследований утверждена РНПЦ оториноларингологии 15.03.2017, зарегистрирована под номером NCT03130374 в Международной базе данных clinicaltrials.gov). В индивидуальном порядке после согласования с этическим комитетом РНПЦ оториноларингологии клеточную терапию провели 1 пациенту (№ 7), у которого имело место нарушение хрящевого каркаса в виде хондрита после комбинированного лечения органического заболевания среднего отдела гортани. Средний возраст пациентов составил 56,1 ± 12,6 года. Данные пациентов, анамнез и лечение, проведенное для восстановления просвета гортани и ревизии дыхательного тракта, представлены в табл. 1.

Таблица 1. **Данные пациентов, включенных в клиническое исследование**

Table 1. **Data of the patients included in the clinical trial**

Пациент (пол, возраст)	Анамнез заболевания и лечение, полученное до проведения клеточной терапии
№ 1 (жен., 51 год)	В 2010 г. струмэктомия, в 2016 г. по экстренным показаниям выполнена трахеостомия. В 2016–2017 гг. до применения МСК 7 госпитализаций, 5 оперативных вмешательств под наркозом
№ 2 (муж., 76 лет)	В 2016 г. выполнена трахеостомия по экстренным показаниям. В 2016–2017 гг. до применения МСК 3 госпитализации, 3 оперативных вмешательства под наркозом
№ 3 (жен., 53 года)	В 2010 г. наложена трахеостома после получения резаной раны шеи. В 2015–2017 гг. до применения МСК 15 госпитализаций, 14 оперативных вмешательств под наркозом
№ 4 (жен., 61 год)	В 2016 г. для проведения эндотрахеального наркоза в связи с невозможностью эндотрахеальной интубации (анатомические особенности) наложена трахеостома. В 2017–2018 гг. до применения МСК 4 госпитализации, 3 оперативных вмешательства
№ 5 (муж., 35 лет)	В 2000–2002 гг. поэтапное лечение по восстановлению просвета гортани и трахеи после интубации после ЧМТ. Ухудшение состояния в 2018 г., до применения МСК 5 госпитализаций, 4 оперативных вмешательства
№ 6 (жен., 63 года)	В 1989 и 1991 гг. выполнена частичная тиреоидотомия. В 1991 г. в послеоперационном периоде возник парез гортани, лечение консервативное и фонопедическая коррекция. В 2017 г. наложена трахеостома по экстренным показаниям. В 2017–2018 гг. 3 госпитализации, 2 оперативных вмешательства
№ 7 (муж., 54 года)	В 2016 г. установлена трахеотомическая трубка после хирургического лечения органического заболевания гортани. В 2017–2018 гг. до применения МСК 4 госпитализации, 3 оперативных вмешательства под наркозом

Пациенты подробно и на доступном уровне были ознакомлены с целью и технологией клеточной терапии и с необходимостью выполнения дополнительных лабораторно-диагностических процедур. С информированного согласия у 7 пациентов произведен забор ткани ОВ для производства БМКП.

В группу сравнения было включено 12 пациентов (6 мужчин и 6 женщин, средний возраст – 56,5 ± 4,5 года) с аналогичным диагнозом (ретроспективный и проспективный анализ) (табл. 2).

Производство и контроль качества БМКП. Первичные культуры получали методом эксплантов. Клетки пересевали в пассажах по стандартной методике с использованием 0,01 % трипсина в растворе Версена (0,02 % ЭДТА в фосфатно-солевом буфере) и культивировали в среде DMEM/F12

Таблица 2. **Данные пациентов группы сравнения**

Table 2. **Data of the patients in the comparison group**

Пациент (пол, возраст)	Анамнез заболевания и полученное лечение
К1 (муж., 56 лет)	С 2013 г. хронический стеноз гортани. Носитель Т-образной трубки. В 2013–2019 гг. 18 госпитализаций
К2 (жен., 48 лет)	С 2016 г. хронический двусторонний паралитический стеноз гортани II степени. Канюленоситель. В 2016–2018 гг. 2 госпитализации. Проведено деканюлирование
К3 (муж., 63 года)	С 2016 г. стеноз гортани. Канюленоситель. В 2016–2017 гг. 2 госпитализации
К4 (жен., 56 лет)	С 2017 г. стеноз гортани. Канюленоситель. В 2017–2018 гг. 1 госпитализация
К5 (жен., 50 лет)	С 2017 г. идиопатический стеноз верхней трети трахеи. Канюленоситель. В 2017 г. 1 госпитализация
К6 (жен., 56 лет)	С 2012 г. хронический двусторонний паралитический стеноз гортани II степени. В 2012–2018 гг. 5 госпитализаций. Проведено деканюлирование
К7 (муж., 61 год)	С 2016 г. стеноз гортани, трахеи. С 2016 г. 5 госпитализаций
К8 (муж., 61 год)	С 2018 г. стеноз гортани. В 2018 г. 2 госпитализации
К9 (жен., 59 лет)	С 2018 г. хронический срединный стеноз гортани. С 2017 г. 6 госпитализаций
К10 (муж., 58 лет)	С 2018 г. стеноз гортани, трахеи. Носитель Т-образной трубки. В 2017–2020 гг. 8 госпитализаций
К11 (муж., 57 лет)	С 2018 г. стеноз гортани, трахеи. Канюленоситель. В 2018 г. 1 госпитализация
К12 (жен., 53 года)	С 2017 г. хронический стеноз гортани. Носитель Т-образной трубки. С 2017 г. 15 госпитализаций

с добавлением 10 % v/v эмбриональной телячьей сыворотки в CO_2-инкубаторе (5 % CO_2) при влажности 95 % и температуре 37 °С. На этапе производства БМКП клетки переводили в суспензию, удаляли остатки трипсина и культуральной среды путем центрифугирования при 200 g, а затем еще 2 раза отмывали с помощью центрифугирования в 0,9 %-ном водном растворе хлорида натрия (физраствор). Перед непосредственным введением пациентам клетки ресуспендировали в 10 %-ном растворе человеческого альбумина в концентрации 10 млн/мл и хранили не более 8 ч при +4 °С [10]. Иммунофенотип и жизнеспособность клеток определяли с помощью стандартных методов. Контроль бактериальной и грибковой контаминации осуществляли путем внесения суспензии МСК ОВ в пробирки с тиогликолевой средой и средой Сабуро, а через 14 сут визуально проводили их учет. Контроль контаминации герпесвирусами (вирусом простого герпеса 1-го и 2-го типа, вирусом Эпштейна–Барра (ВЭБ), цитомегаловирусом (ЦМВ), вирусом герпеса 6-го типа (ВГ-6) осуществляли методом ПЦР с использованием коммерческих тест-систем.

Проведение клеточной терапии. Для предотвращения возможных аллергических реакций немедленного типа перед первым применением МСК ОВ выполняли кожный тест, для чего в область медиальной поверхности предплечья подкожно вводили 0,1 мл взвеси клеток. При отсутствии системных и местных реакций через 30 мин использовали оставшуюся взвесь МСК ОВ. Во время оперативного вмешательства по восстановлению просвета дыхательных путей после удаления рубцовой и грануляционной ткани трахеи и/или гортани по периметру и по всей площади деэпителизированного участка с помощью инсулинового шприца единичными инъекциями подслизисто вводили по 100–200 мкл суспензии МСК ОВ. На участке протяженностью 1 см использовали 10 млн клеток в 1 мл. В послеоперационном периоде осуществляли фиброскопический контроль восстанавливаемого участка.

Оценка количественного содержания субпопуляций лимфоцитов крови (Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические клетки, ЕК- и ЕКТ-клетки, активированные Т-клетки, Т-регуляторные клетки, В-клетки) для контроля безопасности метода.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде Mean ± StdDev и Me (25 %–75 %). Использовали непараметрические методы. Статистическую значимость различий между качественными характеристиками оценивали при помощи критерия χ^2. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение. *Производство и характеристика БМКП.* Для обеспечения биобезопасности при производстве БМКП осуществляли контроль культур на соответствие следующим критериям: 1) внешний вид клеток при росте в монослойной культуре (фибробластоподобная морфология); 2) подлинность клеток (более 90 % клеток экспрессируют CD90 и CD105, менее 3 % клеток – CD31 и CD45); 3) жизнеспособность клеток (более 90 %); 4) микробиологическая безопасность (отсутствие контаминации бактериями, дрожжеподобными грибами, герпесвирусами). Герпесвирусы были включены в перечень анализируемых патогенов на основании результатов предыдущих исследований, указывающих, что в биоптаты ОВ могут быть контаминированы генетическим материалом ЦМВ, ВГ-6, ВЭБ [18].

На протяжении всех сроков культивирования клетки сохраняли фибробластоподобную морфологию, их жизнеспособность составляла более 97 %, фенотип клеток – $CD90^+CD105^+CD31^-CD45^-$, контаминации культур микроорганизмами не выявлено (рис. 1). Таким образом, МСК ОВ удовлетворяли критериям подлинности, жизнеспособности, микробиологической безопасности в соответствии с постановлением Совета Министров РБ от 28.11.2014 г. № 1120 «О некоторых вопросах государственной регистрации биомедицинских клеточных продуктов».

Проведена оценка пролиферативной активности клеток и сроков формирования первичных культур. Сроки формирования первичных гетерогенных по клеточному составу первичных культур ОВ составили 22 (21–28) сут. Высокая пролиферативная активность клеток позволила к 4–6-му пассажу накопить биомассу клеток, необходимую для производства не менее одной единичной дозы БМКП (20 млн клеток). Таким образом, от забора биоптата ОВ до этапа накопления терапевтически значимого количества биомассы потребовалось 4–7 недель. Биомассу МСК ОВ всех пациентов криоконсервировали с целью длительного хранения, чтобы иметь возможность производства БМКП к срокам проведения запланированного хирургического вмешательства. Кратность введения зависела от протяженности стеноза в расчете 10 млн клеток на 1 см протяженности дефекта слизистой оболочки (табл. 3).

Результаты клеточной терапии ХСГТ. После выполнения очередного этапа хирургического лечения, по данным фиброларинготрахеоскопии трахеи и гортани, в послеоперационном периоде без проведения клеточной терапии (стандартный протокол лечения) в течение последующих 7 сут наблюдения отмечались отек слизистой оболочки и рост грануляционной ткани, на поверхности дефекта слизистой выявлялась фибриновая пленка. Из-за выраженного разрастания у пациентов соединительной ткани спустя 2–6 мес. возникала необходимость в повторных хирургических вмешательствах (см. табл. 1).

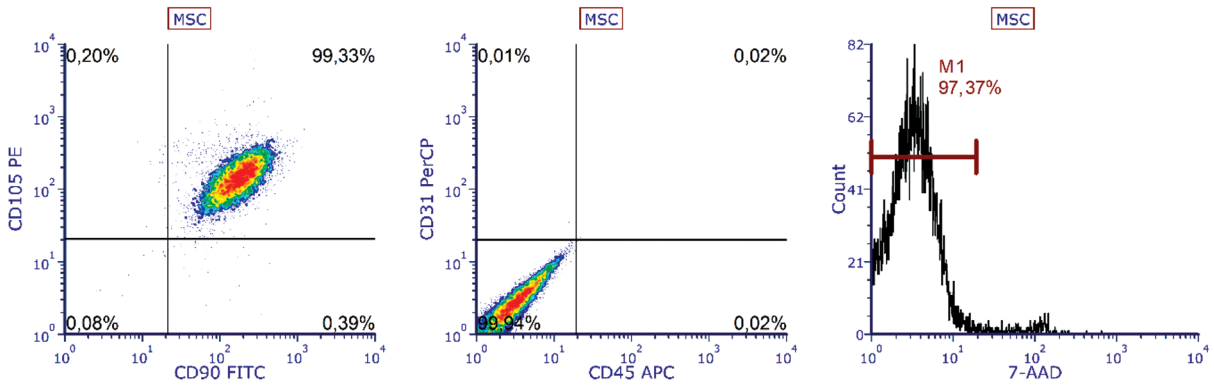


Рис. 1. Иммунофенотипический контроль культур МСК

Fig. 1. Immunophenotypic control of MSC cultures

Т а б л и ц а 3. **Проведение клеточной терапии**

T a b l e 3. **Carrying out cell therapy**

Идентификационный номер пациента	Протяженность стеноза, см	Кратность введения и дозы БМКП
1	2	Однократно 20 млн клеток
2	3	Однократно 30 млн клеток*
3	2	Однократно 20 млн клеток
4	2,5	Двукратно по 25 млн клеток* в один и тот же участок
5	6	Однократно по 30 млн клеток* в разные участки протяженностью по 3 см, поэтапно
6	2,5	Однократно 25 млн клеток*
7	6	Однократно 60 млн клеток

П р и м е ч а н и е. * – клетки восстановлены из криоконсервации.

После проведения клеточной терапии в ранний постоперационный период (5–7-е сутки) отмечались отсутствие воспалительных проявлений или иных локальных и местных реакций, незначительный налет фибрина. В результате осмотра пациентов через 1–3 мес. не выявлено признаков рестенозирования (роста грануляционной ткани, образования рубцов, сужения просвета гортани) (рис. 2).

Пациентке № 4 потребовалось повторное введение БМКП, так как на первом этапе клеточной терапии не удалось полностью восстановить слизистую оболочку по причине плохой переносимости

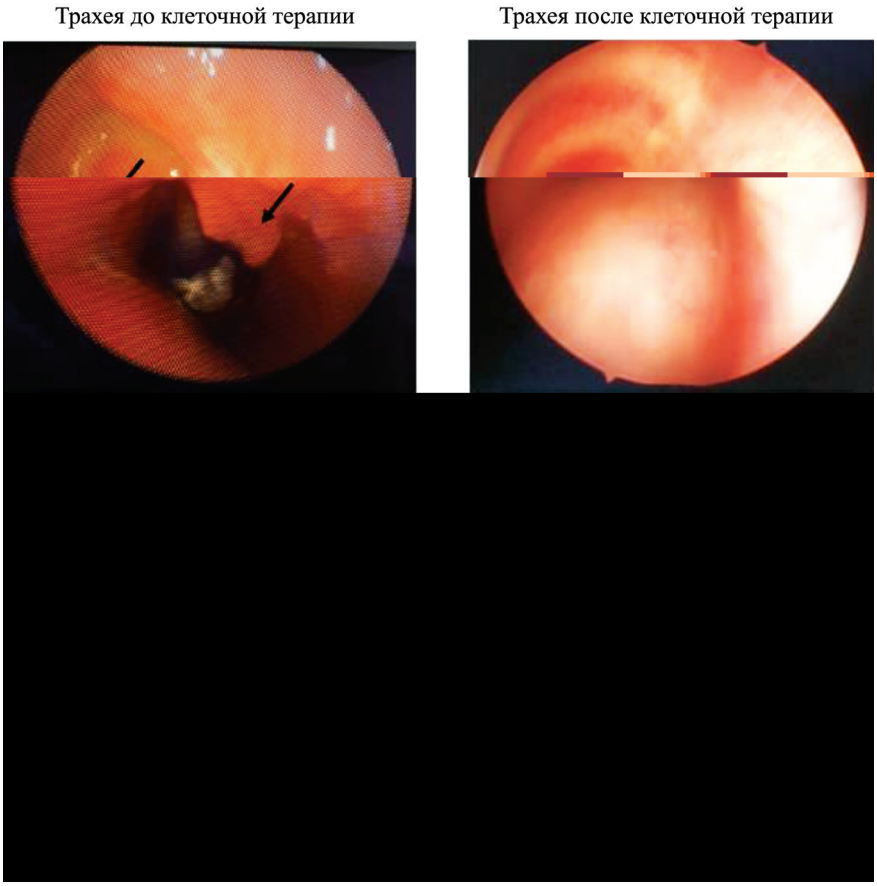


Рис. 2. Фиброларинготрахеоскопия трахеи и гортани пациентки № 1 ретроградно (до применения БМКП после выполнения очередного этапа хирургического лечения по восстановлению просвета гортани, трахеи) и через 2 мес. после проведения клеточной терапии. Стрелками указаны зоны роста грануляционной ткани

Fig. 2. Retrograde fibrolaryngotracheoscopy of the trachea and larynx of patient No. 1 (before the BMCP use after the next stage of surgical treatment to restore the lumen of the larynx, trachea) and in 2 months after cell therapy. The arrows indicate the growth zones of granulation tissue

пациенткой стента. В результате повторного проведения клеточной терапии удалось добиться прекращения рестенозирования.

Пациенту № 5 проведена клеточная терапия в два этапа. Спустя 1 мес. после первого этапа трансплантации МСК ОВ участок на уровне гортани/верхнего отдела трахеи был восстановлен, а признаки рестенозирования на нем отсутствовали. Повторное введение МСК ОВ потребовалось в область сохраняющего рестенозирования – верхний или средний отдел трахеи (частично), куда первый раз БМКП не вводили.

Применение БМКП на основе МСК ОВ при поэтапном лечении позволило выполнить деканюляцию всем пациентам через 2–7 сут после введения БМКП в местах удаленных грануляций. У 2 пациентов трахеостома закрылась самопроизвольно в течение 1 мес., 5 пациентам выполнена пластика трахеостомы в течение 2–4 мес. после трансплантации аутологичных МСК ОВ. Число госпитализаций после применения стволовых клеток до пластики трахеостомы составило 1–2 сут, средний срок пребывания в стационаре – 7 сут.

В связи с тем что у пациента № 7 имело место нарушение хрящевого каркаса вследствие лечения органического заболевания гортани, площадь просвета гортани и трахеи после проведения клеточной терапии в анатомических ориентирах не восстановлена. Ввиду нарастающей дыхательной недостаточности через 3 мес. после клеточной терапии была проведена трахеотомия и установлен стент, в течение 2018–2020 гг. пациент подвергался процедуре трехкратно, в начале апреля 2020 г. выполнена пластика трахеостомы. Вместе с тем, по данным фибролагинготрахеоскопии, эпителиальный слой слизистой оболочки полностью восстановлен, рост грануляционной ткани отсутствует, повторная установка стента не вызывает рестенозирования и деэпителизации. Отсутствие выделения слизи и ее застоя в криптах грануляционной ткани, приводящего к бактериальному обсеменению и поддержанию хронического воспалительного процесса, значительно улучшило качество жизни пациента. Таким образом, в результате клеточной терапии была решена задача по восстановлению эпителиального слоя и предотвращению развития патологической рубцово-грануляционной ткани.

Таблица 4. **Эффективность лечения пациентов с ХСГТ основной группы и группы сравнения, результаты краткосрочного наблюдения (2 года)**

Table 4. **Efficiency of treatment of CSTL patients in the main and comparison groups, the short-term observation results (2 years)**

Показатель	Основная группа (n = 7)	Группа сравнения (n = 12)	p (по критерию χ^2)
Отсутствие формирования рубцово-грануляционной ткани	7/7	6/12	0,024
Эпителизация >90 % дефектов внутренней поверхности гортани/трахеи	7/7	2/12	0,0004
Улучшение дыхания и повышение толерантности к физической нагрузке	6/7	2/12	0,003
Восстановление площади просвета гортани и трахеи в анатомических ориентирах	6/7	2/12	0,003
Отсутствие рестенозирования	7/7	2/12	0,0004

В настоящее время все пациенты наблюдаются амбулаторно, у 6 из них, по данным спирометрии, нет признаков нарастающей дыхательной недостаточности, у 7, по данным фиброларинготрахеоскопии, отсутствуют признаки гранулирования или иного рестенозирования.

Полученные результаты свидетельствуют, что дополнительное проведение клеточной терапии к стандартному лечению ХСТГ статистически достоверно улучшает все показатели, характеризующие восстановление просвета трахеи/гортани.

На основании обследования и изучения лабораторных показателей 7 пациентов до начала, во время и после окончания терапии переносимость клеточной терапии и ее безопасность оценена как хорошая – постинъекционные реакции и/или побочные местные и системные явления (зуд, отечность/инфильтрация прилежащих тканей, повышение температуры тела, аллергические

реакции) отсутствовали. Изучение иммунного статуса пациентов показало, что все показатели находятся в пределах нормы, а признаки иммуносупрессии отсутствуют (не выявлено существенного увеличения содержания Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{hi}CD127^-$), снижения индекса CD4/CD8 и др.).

При наличии нарушений хрящевого каркаса проведение клеточной терапии позволяет восстановить эпителиальный слой слизистой оболочки и предотвратить рестенозирование. В то же время восстановление хрящевого каркаса гортани с помощью данного метода лечения не представляется возможным.

Заключение. Проведены клинические исследования метода клеточной терапии ХСГТ с использованием БМКП на основе МСК ОВ. Протокол клеточной терапии включал одно- или двукратное введение суспензии МСК ОВ в расчете 10 млн клеток на 1 см протяженности дефекта слизистой оболочки в дополнение к стандартному хирургическому лечению.

На основании клинико-лабораторных показателей всех пациентов (n = 7) показано, что переносимость и безопасность метода клеточной терапии до начала, во время и после ее окончания оценивается как хорошая – постинъекционные реакции и/или побочные местные и системные явления, в том числе признаки системной иммуносупрессии, отсутствовали.

Проведение клеточной терапии в дополнение к стандартному хирургическому лечению ХСГТ статистически достоверно уменьшает количество случаев рестенозирования и формирования рубцово-грануляционной ткани, приводит к увеличению площади эпителизации слизистой (7 пациентов из 7), улучшает восстановление площади просвета гортани в анатомических ориентирах, приводит к улучшению показателей дыхания и повышению толерантности к физической нагрузке у пациентов основной группы (у 6 человек из 7). В то же время в группе сравнения эти показатели достоверно ниже (у 2 человек из 12).

В настоящее время пациенты после проведения клеточной терапии наблюдаются амбулаторно и по данным спирометрии не имеют признаков нарастающей дыхательной недостаточности (n = 6), а по данным фиброларинготрахеоскопии у них отсутствуют признаки гранулирования (или иного рестенозирования) (n = 7).

Полученные результаты свидетельствуют о безопасности, хорошей переносимости и клинической эффективности метода клеточной терапии ХСТГ с использованием аутологичных МСК ОВ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Causes and consequences of adult laryngotracheal stenosis / A. Gelbard [et al.] // Laryngoscope. – 2015. – Vol. 125, N 5. – P. 1137–1143. https://doi.org/10.1002/lary.24956

2. Морфологические изменения в трахее при постинтубационном рубцовом стенозе / М. К. Недзведзь [и др.] // Мед. журн. – 2008. – № 1. – С. 43–46.

3. Зенгер, В. Г. Хирургия повреждений гортани и трахеи / В. Г. Зенгер, А. Н. Наседкин, В. Д. Паршин. – М. : Медкнига, 2007. – 364 с.

4. Чайковский, В. В. Опыт применения стентов различных типов при лечении хронических стенозов гортани и трахеи / В. В. Чайковский, В. Л. Чекан, С. Н. Моради // Актуальные проблемы оториноларингологии: материалы и программа Второй междунар. белорус.-польск. конф. по оториноларингологии, 29–30 мая 2003 г., г. Гродно / ред. совет : О. Г. Хоров (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2003. – С. 70–72.

5. Tissue-engineered trachea: a review / J. X. Law [et al.] // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. – 2016. – Vol. 91. – P. 55–63. https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.10.012

6. Сравнительная характеристика эффективности способов и условий трансплантации с использованием стволовых и прогениторных клеток обонятельного эпителия животным с экспериментальной травмой трахеи и гортани / В. Л. Чекан [и др.] // Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток : материалы науч.-техн. совета Программы Союзного государства, г. Минск, 21 мая 2013 г. – Минск, 2013. – С. 39–46.

7. Антоневич, Н. Г. Иммуносупрессивные свойства культивируемых эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия человека // Н. Г. Антоневич, А. Е. Гончаров, В. Л. Чекан // Здравоохранение. – 2014. – № 10. – С. 14–19.

8. Гончаров, А. Е. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки на антигенный профиль дендритных клеток / А. Е. Гончаров, Н. Г. Антоневич, В. Л. Чекан // Новости мед.-биол. наук. – 2015. – Т. 12, № 4. – С. 159–162.

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

10. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки человека на иммунофенотип В-клеток / Н. Г. Антоневич [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2017. – Вып. 10. – С. 270–276.

11. Гончаров, А. Е. Метод получения биомедицинского клеточного продукта на основе мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки носовой полости [Электронный ресурс] / А. Е. Гончаров, Н. Г. Антоневич // Достижения медицинской науки Беларуси. – Режим доступа: http://med.by/dmn/book.php?book=16-19_3. – Дата доступа: 22.10.2017.

12. Изучение вирусологической безопасности культур мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки человека для клинического применения / Н. Г. Антоневич [и др.] // Санитарно-эпидемиологическая служба Республики Беларусь: история, актуальные проблемы на современном этапе и перспективы развития : сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. «Здоровье и окружающая среда», посвящ. 90-летию санит.-эпидемиол. службы Респ. Беларусь (Минск, 28 окт. 2016 г.) / редкол. : Н. П. Жукова [и др.]. – Минск, 2016. – Т. 1. – С. 228–231.

References

1. Gelbard A., Francis D. O., Sandulache V. C., Simmons J. C., Donovan D. T., Ongkasuwan Ju. Causes and consequences of adult laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope*, 2015, vol. 125, no. 5, pp. 1137–1143. https://doi.org/10.1002/lary.24956

2. Nedz'ved' M. K., Tatur A. A., Leonovich S. I., Nerovnya A. M. Morphological changes in the trachea in postintubation cicatricial stenosis. *Meditsinskii zhurnal* [Medical journal], 2008, no. 1, pp. 43–46 (in Russian).

3. Zenger V. G., Nasedkin A. N., Parshin V. D. *Surgery of injuries of the larynx and trachea*. Moscow, Medkniga Publ., 2007. 364 p. (in Russian).

4. Chaikovskii V. V., Chekan V. L., Moradi S. N. Experience of using stents of various types in the treatment of chronic stenosis of the larynx and trachea. *Aktual'nye problemy otorinolaringologii: materialy i programma Vtoroi mezhdunarodnoi belorussko-pol'skoi konferentsii po otorinolaringologii (29–30 maya 2003 goda, Grodno)* [Actual problems of otorhinolaryngology: materials and program of the Second international belarusian-polish conference on otorhinolaryngology (May 29–30, 2003, Grodno)]. Grodno, 2003, pp. 70–72 (in Russian).

5. Law J. X., Liau L. L., Aminuddin B. S., Ruszymah B. H. I. Tissue-engineered trachea: a review. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2016, vol. 91, pp. 55–63. https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.10.012

6. Chekan V. L. Comparative characteristics of the effectiveness of methods and conditions for transplantation using stem and progenitor cells of the olfactory epithelium in animals with experimental trachea and larynx trauma. *Razrabotka novykh metodov i tekhnologii vosstanovitel'noi terapii patologicheski izmenennykh tkanei i organov s ispol'zovaniem stvolovykh kletok: materialy nauchno-tekhnicheskogo soveta Programmy Soyuznogo gosudarstva (Minsk, 21 maya 2013 goda)* [Development of new methods and technologies for restorative therapy of pathologically altered tissues and organs using stem cells: materials of the Scientific and Technical Council of the Union State Program (Minsk, May 21, 2013)]. Minsk, 2013, pp. 39–46 (in Russian).

7. Antonevich N. G., Goncharov A. E., Chekan V. L. Immunosuppressive properties of cultured ectomesenchymal stem cells of human olfactory epithelium. *Zdravookhranenie* [Health care], 2014, no. 10, pp. 14–19 (in Russian).

8. Goncharov A. E., Antonevich N. G., Chekan V. L. Effect of olfactory lining mesenchymal stem cells on the antigenic profile of dendritic cells. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2015, vol. 12, no. 4, pp. 159–162 (in Russian).

9. Antonevich N. G., Goncharov A. E., Bushchik O. V., Rynda E. G., Chekan V. L., Strinkevich E. A. Suppression of the cytotoxic function of CD8+ T-lymphocytes and natural killer cells by mesenchymal stem cells cells of the olfactory lining of the nasal cavity. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 7–16 (in Russian).

10. Antonevich N. G., Goncharov A. E., Bushchik O. V., Romanova I. V. Influence of mesenchymal stem cells of the human olfactory lining on the immunophenotype of B cells. *Sovremennye problemy infektsionnoi patologii cheloveka: sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 10* [Modern problems of infectious human pathology: collection of scientific papers. Issue 10]. Minsk, 2017, pp. 270–276 (in Russian).

11. Goncharov A. E., Antonevich N. G. A method of obtaining a biomedical cell product based on mesenchymal stem cells of the olfactory lining of the nasal cavity. *Achievements of medical science in Belarus*. Available at: http://med.by/dmn/book.php?book=16-19_3 (accessed 22.10.2017) (in Russian).

12. Antonevich N. G., Goncharov A. E., Kvacheva Z. B., Chekan V. L. Study of virological safety of human olfactory lining mesenchymal stem cell cultures for clinical use. *Sanitarno-epidemiologicheskaya sluzhba Respubliki Belarus': istoriya, aktual'nye problemy na sovremennom etape i perspektivy razvitiya: sbornik nauchnykh trudov Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii "Zdorov'e i okruzhayushchaya sreda", posvyashchennoi 90-letiyu sanitarno-epidemiologicheskoi sluzhby Respubliki Belarus' (Minsk, 28 oktyabrya 2016 goda). Tom 1)* [Sanitary and Epidemiological Service of the Republic of Belarus: history, current problems and development prospects: collection of scientific papers of the International scientific and practical conference "Health and Environment" dedicated to the 90th anniversary of the sanitary and epidemiological service of the Republic of Belarus (Minsk, October 28, 2016). Vol. 1]. Minsk, 2016, pp. 228–231 (in Russian).

Информация об авторах

Антоневич Наталья Георгиевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: antonevich.n@gmail.com

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

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

Шулепова Эльвира Анатольевна – канд. мед. наук, доцент, ст. преподаватель. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. Сухая, 8, 220004, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lor_sea@tut.by

Рында Елена Геннадьевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alenarynda@gmail.com

Information about the authors

Natalia G. Antonevich – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antonevich.n@gmail.com

Andrei Y. Hancharou – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, 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

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

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

Alena H. Rynda – Junior 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: alenarynda@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.62-009.11-039.73-089-053.2
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-427-436

Поступила в редакцию 02.07.2020
Received 02.07.2020

В. И. Дубров[1], А. В. Строцкий[2]

[1]2-я городская детская клиническая больница, Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ ЭКСТРАВЕЗИКАЛЬНОЙ ОПЕРАЦИИ ПРИ ПУЗЫРНО-МОЧЕТОЧНИКОВОМ РЕФЛЮКСЕ У ДЕТЕЙ

Аннотация. Цель исследования – сравнить результаты лечения пузырно-мочеточникового рефлюкса (ПМР) у детей, которым с использованием экстравезикального лапароскопического доступа выполнена операция как по разработанной авторами методике, так и общепринятым методом.

Проведено проспективное клиническое исследование, в которое было включено 111 пациентов (34 (30,6 %) мальчика, 77 (69,4 %) девочек), перенесших лапароскопическую экстравезикальную антирефлюксную операцию. Возраст пациентов составил от 6 мес. до 17 лет (медиана – 34,7 мес.). Односторонний рефлюкс наблюдался у 85 (76,6 %) детей, двусторонний – у 26 (23,4 %), общее количество мочеточников составило 137. У всех пациентов был диагностирован ПМР III (28,5 %) и IV (71,5 %) степени. В 38 (27,7 %) мочеточниках имелось полное удвоение, в 4 (2,9 %) был диагностирован парауретеральный дивертикул. В зависимости от метода операции все пациенты были разделены на две группы. В основную группу вошли 73 пациента (91 мочеточник), которым была выполнена лапароскопическая операция с фиксацией мочеточника по предложенному нами способу; в контрольную – 38 детей (46 мочеточников), перенесших операцию по стандартной методике.

Средняя продолжительность операции составила в основной группе 109,8 ± 31,5 мин для односторонней операции и 176 ± 47,6 мин для двусторонней, в контрольной группе – 118,6 ± 34,3 и 209,5 ± 51,2 мин соответственно ($p > 0,05$).

Отдаленные результаты прослежены за период не менее 6 мес. Рецидив рефлюкса с одной стороны выявлен у 2 (2,7 %) пациентов после операции с фиксацией мочеточника и у 8 (21,1 %) детей после стандартной операции ($p = 0,002$). Эффективность хирургического лечения в плане устранения рефлюкса по количеству прооперированных мочеточников составила в основной группе 97,8 %, в контрольной – 82,6 % ($p = 0,03$).

Установлено, что лапароскопическая экстравезикальная антирефлюксная операция является безопасным и эффективным вмешательством. Применение модифицированной методики позволяет уменьшить частоту рецидивов ПМР и предупредить развитие послеоперационных осложнений.

Ключевые слова: пузырно-мочеточниковый рефлюкс, лапароскопия, антирефлюксная операция, реимплантация мочеточника, дети

Для цитирования: Дубров, В. И. Результаты лапароскопической экстравезикальной операции при пузырно-мочеточниковом рефлюксе у детей / В. И. Дубров, А. В. Строцкий // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 427–436. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-427-436

Vitaly I. Dubrov[1], Alexandr V. Strotsky[2]

[1]2nd City Children Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

RESULTS OF LAPAROSCOPIC EXTRAVESICAL ANTIREFLUX OPERATION IN VESICOURETERAL REFLUX IN CHILDREN

Abstract. The objective was to improve the results of surgical treatment of vesicoureteral reflux in children, using laparoscopic access.

The prospective study was performed in 111 children (137 ureters) with the primary III–IV grade vesicoureteral reflux. The mean age was 34.7 months. The modified laparoscopic antireflux technique was performed on 73 children (91 ureters). We compared the perioperative complications and the medium-term outcome with a group of 38 children (46 ureters) who underwent classical laparoscopic extravesical reimplantation.

In the modified group, the mean surgery time was 109.8 ± 31.5 minutes for unilateral cases and 176.5 ± 47.6 minutes for bilateral cases; in the classical group, it was 118.6 ± 34.3 and 209.5 ± 51.2 minutes respectively ($p > 0.05$). Postoperative vesicoureteral reflux had 2 (2.7 %) patients in the main group and 8 (21.1 %) children in the control group ($p = 0.002$). There was no ureteral obstruction in the both groups. The success rate for ureters was 97.8 % with modified technique versus 82.6 % after classical laparoscopic reimplantation ($p = 0.003$).

© Дубров В. И., Строцкий А. В., 2020

Laparoscopic extravesical ureteral reimplantation is a safe and effective surgical procedure. The modified technique may improve the surgical treatment results.

Keywords: vesicoureteral reflux, laparoscopy, antireflux surgery, ureteral replantation, children

For citation: Dubrov V. I., Strotsky A. V. Results of laparoscopic extravesical antireflux operation in vesicoureteral reflux in children. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 427–436 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-427-436

Введение. Открытая экстравезикальная антирефлюксная операция без отсечения мочеточника и вскрытия мочевого пузыря была описана в начале 1960-х годов хирургами W. Gregoir [1] и R. Lich [2]. По сравнению с внутрипузырной реимплантацией мочеточника такой подход имеет существенные преимущества, которые заключаются в отсутствии гематурии, снижении болевых ощущений, непродолжительном дренировании мочевого пузыря, менее длительной госпитализации при одинаковой эффективности (94 %). Однако, несмотря на высокую результативность примененного авторами метода, операция не получила широкого признания в связи с тем, что в большинстве случаев частота устранения пузырно-мочеточникового рефлюкса (ПМР) не превышала 85 % [3].

В 1971 г. S. Daines и N. Hodgson [4] описали модификацию внепузырной операции, а в 1987 г. M. Zaontz с соавт. [5] еще в большей степени усовершенствовали методику, что позволило повысить эффективность лечения ПМР до 93 %. Основной принцип модификации заключался в выполнении детрузоротомии дистальнее устья мочеточника с последующим перемещением устья в каудальном направлении и его фиксацией к детрузору в зоне мочепузырного треугольника, что позволяет несколько увеличить длину подслизистого тоннеля и предупредить ретракцию мочеточника. Предложенная авторами модифицированная техника нашла широкое применение, в том числе как амбулаторная процедура [6].

В 1994 г. R. M. Ehrlich с соавт. [7] впервые описали два случая успешного выполнения лапароскопической экстравезикальной антирефлюксной операции (ЛЭАО) по принципу Lich-Gregoir. За последнее десятилетие опубликовано значительное количество работ, посвященных этому методу, в том числе с использованием роботической техники, при этом показатель эффективности процедуры в различных исследованиях варьировался от 72 до 100 % [8–10].

ЛЭАО применяется в нашей клинике на протяжении длительного периода времени. В связи с тем что при использовании классической методики отмечена высокая частота рецидива ПМР, нами предложена модификация, которая позволяет повысить эффективность хирургического лечения. В данной статье проведено сравнение результатов ЛЭАО при лечении ПМР у детей с использованием классической и модифицированной методик.

Цель настоящего исследования – улучшить результаты хирургического лечения пузырно-мочеточникового рефлюкса у детей с использованием лапароскопического доступа.

Материалы и методы исследования. Проведено проспективное клиническое исследование, в которое было включено 111 пациентов (34 (30,6 %) мальчика, 77 (69,4 %) девочек), перенесших ЛЭАО в период с 2012 по 2019 г., на базе урологического отделения 2-й городской детской клинической больницы г. Минска. Возраст пациентов составил от 6 мес. до 17 лет (медиана – 34,7 мес., интерквартильный интервал – 20,7–65,0). Односторонний рефлюкс наблюдался у 85 (76,6 %) детей, двусторонний – у 26 (23,4 %), общее количество мочеточников составило 137. В соответствии с классификацией Международного комитета по изучению рефлюкса у всех пациентов был диагностирован ПМР III–IV степени: ПМР III степени – в 39 (28,5 %) мочеточниках, IV степени – в 98 (71,5 %). В 38 (27,7 %) мочеточниках имелось полное удвоение, в 4 (2,9 %) был диагностирован парауретеральный дивертикул. Предшествующая эндоскопическая коррекция была проведена в 56 (40,9 %) мочеточниках.

Обследование пациентов включало лабораторные тесты, ультразвуковое исследование, микционную цистоуретрографию и статическую нефросцинтиграфию. Дети, приученные к туалету, заполняли дневник мочеиспусканий. Пациентам выполнялась также урофлоуметрия, при необходимости они проходили полное уродинамическое обследование. При наличии дисфункции мочевого пузыря проводили консервативную терапию, хирургическое лечение применяли только

при сохранении ПМР на фоне нормализации функции нижних мочевых путей. Пациентов с нейрогенным мочевым пузырем, органической инфравезикальной обструкцией, предшествующими открытыми и лапароскопическими операциями на тазовых органах в исследование не включали. Кроме того, нами не применялась ЛЭАО при лечении ПМР V степени из-за высокой вероятности сочетания рефлюкса и обструкции мочеточника. По нашему мнению, для мегауретера, в том числе рефлюксирующего, целесообразно применять уретероцистонеоанастомоз с отсечением мочеточника от мочевого пузыря.

В зависимости от метода операции все пациенты были разделены на две группы. Основную группу составили 73 пациента (91 мочеточник), которым была выполнена ЛЭАО с фиксацией мочеточника по предложенной нами методике. В контрольную группу были включены 38 детей (46 мочеточников), перенесших лапароскопическую операцию по стандартной методике. Показания к операции включали рецидивирующую инфекцию мочевых путей и прогрессирующее рубцевание почек по данным нефросцинтиграфии при неэффективности или предполагаемой по результатам цистоскопии неэффективности эндоскопической коррекции ПМР. Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

Таблица 1. **Характеристика пациентов основной и контрольной групп**

Table 1. **Characteristics of patients in the main and control groups**

Показатель	Основная группа	Контрольная группа	*p*
К-во пациентов	73	38	–
Возраст, мес. (Me (LQ–UQ))	34,7 (20,0–64,3)	36,0 (21,6–74,2)	0,587*
Пол, *n* (%): мальчики девочки	 26 (35,6) 47 (64,4)	 8 (21,1) 30 (78,9)	0,115**
ПМР, *n* (%): односторонний двусторонний	 55 (75,3) 18 (24,7)	 30 (78,9) 8 (21,1)	0,850**
К-во мочеточников	91	46	–
Степень ПМР, к-во мочеточников (%): III IV	 24 (26,4) 67 (73,6)	 15 (32,6) 31 (67,4)	0,446**
Полное удвоение мочеточника, к-во мочеточников (%)	23 (25,3)	15 (32,6)	0,366**
Предшествующая эндоскопическая коррекция, к-во мочеточников (%)	35 (38,5)	21 (45,7)	0,419**
Парауретеральный дивертикул, к-во мочеточников (%)	2 (2,2)	2 (4,3)	0,602***

Примечание. * – *U*-тест Манна–Уитни; ** – критерий χ^2; *** – точный критерий Фишера.

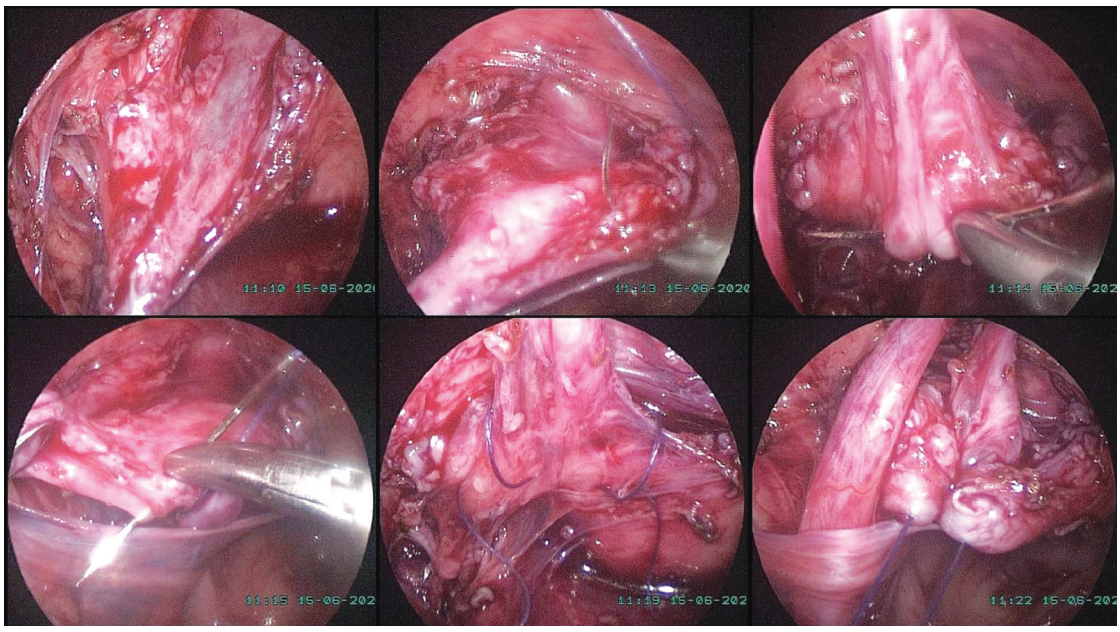
Техника операций. Операции проводили лапароскопическим доступом, под общим обезболиванием, в положении пациента лежа на спине. У пациентов с двусторонним ПМР, независимо от использованной техники, операцию выполняли симультанно с обеих сторон. Предоперационно выполняли цистоуретроскопию для оценки состояния уретры и мочевого пузыря, локализации мочеточниковых устьев и выявления сопутствующих аномалий мочевыводящих путей. После завершения цистоскопии трансуретрально устанавливали катетер Фолея возрастного размера, к которому подключали инфузионную систему для заполнения и опорожнения мочевого пузыря во время операции. Карбоперитонеум накладывали при помощи иглы Вереша, в брюшную полость устанавливали три лапароскопических троакара. В зависимости от возраста ребенка применяли троакары для эндоскопа и инструментов диаметром 3 или 5 мм. Троакар для лапароскопа вводили по краю пупка, троакары для инструментов – с обеих сторон по передней подмышечной линии немного ниже уровня пупка. На заднелатеральной поверхности мочевого пузыря, дистальнее семявыносящего протока у мальчиков или круглой связки матки у девочек, рассекали брюшину. Мочевой пузырь опорожняли полностью, выделяли заднебоковую стенку мочевого пузыря и мочеточник в юкставезикальном отделе. Для улучшения визуализации уретеро-

везикального соустья мочевой пузырь подтягивали к брюшной стенке при помощи одной или двух нитей-держалок, после чего заполняли 40–60 мл физиологического раствора. Выполняли детрузоротомию до слизистой оболочки от места вхождения мочеточника в стенку мочевого пузыря в проксимальном направлении. В зависимости от ширины мочеточника создавали подслизистый отдел длиной от 3 до 5 см, с таким расчетом, чтобы соотношение диаметра мочеточника и длины тоннеля составляло 1:5. При повреждении слизистой оболочки мочевого пузыря ее ушивали узловыми швами (полигликолид 5/0). Следующий этап операции зависел от применяемого метода. При выполнении операции по стандартной методике мочеточник мобилизовали до места перехода в слизистую оболочку мочевого пузыря, при этом полностью пересекали мышечные волокна между мочеточником и детрузором. На этом этапе у пациентов, перенесших эндоскопическую коррекцию ПМР, удаляли объемообразующий препарат. После завершения детрузоротомии мочеточник укладывали на слизистую оболочку мочевого пузыря и над ним узловыми швами (полигликолид 4/0–3/0) ушивали рассеченный детрузор. На входе в подслизистый тоннель 1–2 узловыми швами (полигликолид 5/0) выполняли фиксацию мочеточника к детрузору. Над мочевым пузырем ушивали брюшину, троакары извлекали из брюшной полости и накладывали швы на кожные разрезы. Мочевой пузырь дренировали уретральным катетером в течение 1–2 сут. Дренаж в брюшную полость устанавливали на 1 сут только при вскрытии слизистой оболочки мочевого пузыря, в этих случаях длительность деривации мочи уретральным катетером составляла 4 сут.

При применении разработанного способа отличие заключалось в том, что детрузор рассекали только по передней поверхности мочеточника до проксимального угла уретеровезикального соустья. Латеральнее и дистальнее устья мочеточника детрузоротомию не проводили, таким образом мочеточник оставался фиксированным к детрузору с трех сторон. При формировании подслизистого тоннеля дистальный шов накладывали в виде полукисета, с прошиванием детрузора в зоне боковых стенок разреза и дистальнее устья мочеточника (см. рисунок). Это позволяло прикрепить уретеровезикальное соустье к мочепузырному треугольнику и погрузить его в полость мочевого пузыря. Дальнейший ход операции не отличался от стандартной методики.

Парауретеральный дивертикул полностью выделяли на этапе детрузоротомии. В зависимости от размеров дивертикул либо удаляли с ушиванием дефекта слизистой оболочки, либо погружали в мочевой пузырь [11].

Через 6–8 мес. после операции всем пациентам было проведено контрольное обследование, включающее ультразвуковое исследование и микционную цистоуретрографию. Хорошим



Этапы наложения фиксирующего шва

Steps for applying the fixing stitch

результатом считали отсутствие или положительную динамику дилатации чашечно-лоханочной системы и мочеточника, полное устранение ПМР. Проводили сравнение характеристик пациентов обеих групп, длительности операций, периоперационных осложнений и отдаленных результатов лечения.

Статистический анализ. Для проверки нормальности распределения полученных совокупностей количественных признаков применяли критерии Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова, при сравнении использовали *t*-критерий Стьюдента и *U*-критерий Манна–Уитни. Для анализа качественных признаков применяли коэффициент соответствия χ^2 и двусторонний вариант точного критерия Фишера. Отличия между группами считали статистически значимыми при вероятности безошибочного прогноза не менее 95 % ($p < 0,05$). Для статистической обработки результатов исследования использовали программы MS Excel и STATISTICA 13.

Результаты исследования. У всех пациентов операции были завершены лапароскопически, конверсий не наблюдалось. Интраоперационные осложнения в виде перфорации слизистой мочевого пузыря отмечены у 15 (20,5 %) пациентов основной группы и у 13 (34,2 %) – контрольной. Кровопотеря была клинически и лабораторно незначимой у всех пациентов. Средняя продолжительность операции составила в основной группе 109,8 ± 31,5 мин для односторонней операции и 176,5 ± 47,6 мин для двусторонней, в контрольной группе – 118,6 ± 34,3 и 209,5 ± 51,2 мин соответственно ($p > 0,05$, *U*-тест Манна–Уитни).

Осложнения в раннем послеоперационном периоде наблюдались в общей сложности у 3 (2,7 %) пациентов, из них в основной группе – у 1 (1,4 %) ребенка, в контрольной – у 2 (5,3 %) детей ($p = 0,269$, критерий Фишера). Мочевой затек в брюшную полость диагностирован у 2 детей (по одному ребенку в каждой группе). В обоих случаях была выполнена диагностическая лапароскопия с дренированием брюшной полости и последующим стентированием мочеточников. Задержка мочеиспускания после удаления уретрального катетера отмечена у одного пациента в контрольной группе. Мочеиспускание восстановилось после продленной катетеризации мочевого пузыря в течение 7 сут. По шкале Клавьена–Диндо одно осложнение отнесено к степени I, два осложнения классифицированы как степень IIIб.

Отдаленные результаты прослежены за период от 6 мес. до 6 лет. Рецидив ПМР с одной стороны по результатам контрольной микционной цистоуретрографии выявлен у 2 (2,7 %) пациентов после операции с фиксацией мочеточника и у 8 (21,1 %) детей после стандартной операции ($p = 0,002$). Частота рецидива ПМР по количеству мочеточников составила 2,2 % в основной группе и 17,4 % в контрольной ($p = 0,003$). Случаев развития обструкции мочеточника в отдаленные сроки после операции не отмечено. Эффективность хирургического лечения по пациентам при использовании предложенного нами метода операции составила 97,3 %, а при применении стандартной методики – 78,9 %, по количеству прооперированных мочеточников – 97,8 и 82,6 % соответственно. Нами не выявлено статистически значимых различий в результатах лечения в зависимости от возраста и пола пациентов, степени рефлюкса, односторонней или двусторонней операции, наличия удвоения мочеточника и ранее проведенной эндоскопической коррекции. Осложнения и отдаленные результаты хирургического лечения представлены в табл. 2.

Таблица 2. **Осложнения, отдаленные результаты и эффективность хирургического лечения**

Table 2. **Complications, long-term results and effectiveness of surgical treatment**

Показатель	Основная группа	Контрольная группа	*p* (точный критерий Фишера)
Мочевой затек, к-во случаев (%)	1 (1,4)	1 (2,6)	0,269
Транзиторная задержка мочи, к-во случаев (%)	0	1 (2,6)	0,342
Рецидив ПМР:			
к-во случаев (%)	2 (2,7)	8 (21,1)	0,002
к-во мочеточников (%)	2 (2,2)	8 (17,4)	0,003
Успешный результат:			
к-во случаев (%)	71 (97,3)	30 (78,9)	0,002
к-во мочеточников (%)	89 (97,8)	38 (82,6)	0,003

Обсуждение. ЛЭАО является сложным медицинским вмешательством, особенно трудоемки манипуляции в условиях ограниченного пространства малого таза [12]. В связи с технической сложностью операция не получила широкого распространения (в литературе имеется небольшое количество сообщений об использовании метода). Роботизированная техника обеспечивает для хирурга неоспоримые преимущества, поэтому в большинстве исследований, посвященных лапароскопической коррекции рефлюкса у детей, вмешательства выполняли, используя медицинского робота [9, 10, 13].

Как и при открытом подходе, ЛЭАО может быть выполнена как по классической, так и по модифицированной технике. В литературе описано несколько вариантов дистального продвижения и фиксации мочеточника при лапароскопическом подходе [14, 15]. Чаще всего применяют две различные модификации: описанную M. Zaontz для открытой операции и так называемую «перевернутую Y», при которой пересекаются боковые пучки детрузора, идущие к мочеточнику. При этом в обоих случаях необходимо проведение детрузоротомии дистальнее устья мочеточника.

Модифицированные открытые операции позволяют увеличить частоту разрешения ПМР, но основной проблемой, возникавшей при их применении, было развитие у пациентов транзиторных нарушений мочеиспускания в раннем послеоперационном периоде после двусторонней операции [16, 17]. Частота такого осложнения составляла от 8 до 20 %. Нарушения мочеиспускания могут быть разной степени выраженности, проявляться как острой, так и хронической задержкой мочи, однако они носят обратимый характер. Как правило, самостоятельное мочеиспускание восстанавливается в течение 2 недель на фоне установки постоянного уретрального катетера или чистой периодической катетеризации мочевого пузыря [18].

Считается, что причиной задержки мочи является повреждение веток тазового нервного сплетения. J. Leissner с соавт. [19] изучили анатомию стволов тазового нервного сплетения на трупах взрослых людей для понимания механизма их повреждения во время экстравезикальной антирефлюксной операции. В дальнейшем S. Yucel и L. Baskin [20] уточнили нейроанатомию дистального отдела мочеточника и уретеровезикального соустья с помощью иммуногистохимического анализа и методов трехмерной визуализации у нормальных плодов человека в возрасте от 21 до 40 недель беременности. В обоих исследованиях было показано, нервные стволы проходят по дорсомедиальной поверхности дистального отдела мочеточника под оболочкой Вальдейера, в области уретеровезикального соустья они переходят в мышечные волокна мочепузырного треугольника. При выполнении детрузоротомии дистальнее устья мочеточника нервные стволы пересекаются или повреждаются электрокоагуляцией. При двусторонней операции повреждение нервных стволов приводит к развитию нарушений мочеиспускания в послеоперационном периоде. Было высказано мнение, что для предотвращения развития осложнений при двустороннем ПМР коррекцию целесообразно проводить в два этапа.

Несколько клинических исследований с использованием классической ЛЭАО продемонстрировали успешные результаты в 75–100 % случаев [12, 13, 21–25]. При этом задержка мочи была относительно редким осложнением, которое наблюдалось при двусторонних операциях с частотой не более 5 %. Однако работы, где эффективность достигала 98–100 %, следует оценивать с осторожностью, так как у многих пациентов рентгенологический контроль не проводили и результат оценивали только по клиническим данным [12, 24, 25].

Предполагалось, что модифицированные методики ЛЭАО позволят повысить частоту устранения ПМР. Y. Kojima с соавт. [14] провели рандомизированное исследование, в котором сравнили результаты ЛЭАО с дистальным продвижением и фиксацией мочеточника и без него. Эффективность классической способа составила 80 %, а при использовании модификации по принципу M. Zaontz – 100 %. Ни в одном случае не было зафиксировано нарушений мочеиспускания в послеоперационном периоде. Аналогичный результат описан Y. Lakshmanan, L. C. Fung [15] при применении модификации «перевернутая Y».

В других исследованиях результативность модифицированной ЛЭАО была гораздо ниже. Рецидив ПМР выявлялся у 2–18 % пациентов, а кроме того, резко возросла частота послеоперационной задержки мочи (20–37 % случаев) [10, 26–28].

Целью разработки нашей модификации являлось увеличение частоты разрешения ПМР при минимальном риске послеоперационных осложнений. Для предупреждения повреждения веток тазового нервного сплетения и развития нарушений мочеиспускания мы отказались от рассечения детрузора дистальнее уретеровезикального соустья и применения приема продвижения мочеточника. Разработанная техника не предполагает пересечения боковых пучков детрузора, идущих к мочеточнику, детрузоротомия выполняется только по передней поверхности мочеточника до проксимального угла уретеровезикального соустья. При наложении дистального полукисетного шва устье мочеточника прикрепляется к зоне мочепузырного треугольника, что снижает вероятность выскальзывания мочеточника из подслизистого тоннеля. Кроме того, устье погружается в полость мочевого пузыря, что еще в большей степени усиливает антирефлюксный механизм. В результате применения метода эффективность операции увеличилась от 83 до 98 % ($p = 0{,}003$), у 18 пациентов с двусторонним ПМР ни в одном случае не наблюдалось задержки мочи в послеоперационном периоде.

В нескольких исследованиях описано серьезное послеоперационное осложнение в виде мочевого затека в брюшную полость и забрюшинное пространство в 2–6 % случаев [10, 13, 15]. После ретроспективного просмотра видеозаписей этих операций авторы пришли к заключению, что причиной осложнений являлись агрессивные манипуляции в зоне уретеровезикального соединения и чрезмерное применение электрокоагуляции, которые могли привести к ишемии и повреждению мочеточника. На основании этого анализа был предложен ряд рекомендаций для профилактики данного осложнения. В нашем исследовании у 2 (1,8 %) пациентов выявлен мочевой затек, в обоих случаях были выполнены диагностическая лапароскопия с дренированием брюшной полости и стентирование мочеточников. Отдаленный результат у этих детей был хороший и дополнительных операций не потребовалось. В настоящее время мы следуем описанным в других исследованиях рекомендациям по снижению травматичности манипуляций. Так, при мобилизации дистального отдела мочеточника и выполнении детрузоротомии мы не захватываем мочеточник в зажим, а используем резиновую петлю в качестве держалки, стараемся сохранить сосуды и адвентицию неповрежденными, рассечение тканей производим острым путем с минимальным применением электрокоагуляции. Кроме того, применяемое нами ограниченное выделение уретеровезикального соустья только по передней поверхности снижает вероятность повреждения мочеточника.

Настоящее исследование, посвященное ЛЭАО, является самым большим из описанных в литературе по количеству включенных в него пациентов, прооперированных в одном центре. Все дети прошли полное обследование в послеоперационном периоде, что позволяет достоверно оценить результаты лечения.

Заключение. Разработанная методика ЛЭАО является безопасной и эффективной процедурой. Выделение мочеточника только по передней поверхности с фиксацией уретровезикального соустья и погружением его в мочевой пузырь – простой, технически выполнимый прием, позволяющий повысить частоту разрешения ПМР и предупредить развитие послеоперационных осложнений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Gregoir, W. Congenital vesico-ureteral reflux / W. Gregoir // Acta. Urol. Belg. – 1962. – Vol. 30. – P. 286–300.

2. Lich, R. Ureteral reflux, its significance and correction / R. Lich, L. W. Howerton, L. A. Davis // South. Med. J. – 1962. – Vol. 55, N 6. – P. 633–635. https://doi.org/10.1097/00007611-196206000-00020

3. Hendren, W. H. Reoperation for the failed ureteral reimplantation / W. H. Hendren // J. Urol. – 1974. – Vol. 111, N 3. – P. 403–411. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)59976-0

4. Daines, S. L. Management of reflux in total duplication anomalies / S. L. Daines, N. B. Hodgson // J. Urol. – 1971. – Vol. 105, N 5. – P. 720–724. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)61616-1

5. Detrusorrhaphy: extravesical ureteral advancement to correct vesicoureteral reflux in children / M. R. Zaontz [et al.] // J. Urol. – 1987. – Vol. 138, N 4, pt. 2. – P. 947–949. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)43466-5

6. Palmer, J. S. Extravesical ureteral reimplantation: an outpatient procedure / J. S. Palmer // J. Urol. – 2008. – Vol. 180, N 4S. – P. 1828–1831. https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.04.080

7. Ehrlich, R. M. Laparoscopic vesicoureteroplasty in children: initial case reports / R. M. Ehrlich, A. Gershman, G. Fuchs // Urology. – 1994. – Vol. 43, N 2. – P. 255–261. https://doi.org/10.1016/0090-4295(94)90058-2

8. Дубров, В. И. Модифицированная односторонняя лапароскопическая экстравезикальная антирефлюксная операция / В. И. Дубров, С. Г. Бондаренко, И. М. Каганцов // Рос. вестн. детск. хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2018. – Т. 8, № 2. – С. 26–34.

9. Robot-assisted extravesical ureteral reimplantation (revur) for unilateral vesico-ureteral reflux in children: results of a multicentric international survey / C. Esposito [et al.] // World J. Urol. – 2018. – Vol. 36, N 3. – P. 481–488. https://doi.org/10.1007/s00345-017-2155-9

10. Robotic assisted laparoscopic ureteral reimplantation in children: case matched comparative study with open surgical approach / G. S. Marchini [et al.] // J. Urol. – 2011. – Vol. 185, N 5. – P. 1870–1875. https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.12.069

11. Лапароскопическая резекция дивертикула мочевого пузыря у детей / И. М. Каганцов [и др.] // Рос. вестн. детск. хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2019. – Т. 9, № 3. – С. 51–57.

12. Laparoscopic vesico-ureteral reimplantation with Lich-Gregoir approach in children: medium term results of 159 renal units in 117 children / V. Soulier [et al.] // World J. Urol. – 2017. – Vol. 35, N 11. – P. 1791–1798. https://doi.org/10.1007/s00345-017-2064-y

13. Robotassisted laparoscopic extravesical ureteral reimplant: a critical look at surgical outcomes / D. Herz [et al.] // J. Pediatr. Urol. – 2016. – Vol. 12, N 6. – P. 402.e1–402.e9. https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2016.05.042

14. Ureteral advancement in patients undergoing laparoscopic extravesical ureteral reimplantation for treatment of vesicoureteral reflux / Y. Kojima [et al.] // J. Urol. – 2012. – Vol. 188, N 2. – P. 582–587. https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.04.018

15. Lakshmanan, Y. Laparoscopic extravesicular ureteral reimplantation for vesicoureteral reflux: recent technical advances / Y. Lakshmanan, L. C. Fung // J. Endourol. – 2000. – Vol. 14, N 7. – P. 589–594. https://doi.org/10.1089/08927790050152203

16. Urinary retention after bilateral extravesical ureteral reimplantation: does dissection distal to the ureteral orifice have a role? / D. Barrieras [et al.] // J. Urol. – 1999. – Vol. 162, N 3, pt. 2. – P. 1197–2000.

17. Voiding efficiency after ureteral reimplantation: a comparison of extravesical and intravesical techniques / L. C. Fung [et al.] // J. Urol. – Vol. 153, N 6. – P. 1972–1975. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(01)67381-6

18. Voiding dysfunction after bilateral extravesical detrusorrhaphy / E. Minevich [et al.] // J. Urol. – 1998. – Vol. 160, N 3, pt. 2. – P. 1004–1006. https://doi.org/10.1097/00005392-199809020-00010

19. The pelvic plexus and antireflux surgery: topographical findings and clinical consequences / J. Leissner [et al.] // J. Urol. – 2001. – Vol. 165, N 5. – P. 1652–1655. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(05)66384-7

20. Yucel, S. Neuroanatomy of the ureterovesical junction: clinical implications / S. Yucel, L. S. Baskin // J. Urol. – 2003. – Vol. 170, N 3. – P. 945–948. https://doi.org/10.1097/01.ju.0000082728.20298.ac

21. Tsai, Y. C. Minilaparoscopic nerve-sparing extravesical ureteral reimplantation for primary vesicoureteral reflux: a preliminary report / Y. C. Tsai, C. C. Wu, S. S. Yang // J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech A. – 2008. – Vol. 18, N 5. – P. 767–770. https://doi.org/10.1089/lap.2007.0241

22. Riquelme, M. Laparoscopic extravesical transperitoneal approach for vesicoureteral reflux / M. Riquelme, A. Aranda, C. Rodriguez // J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech. A. – 2006. – Vol. 16, N 3. – P. 312–316. https://doi.org/10.1089/lap.2006.16.312

23. Peters, C. A. Robotically assisted surgery in pediatric urology / C. A. Peters // Urol. Clin. North Am. – 2004. – Vol. 31, N 4. – P. 743–752. https://doi.org/10.1016/j.ucl.2004.06.007

24. Robot-assisted laparoscopic ureteral reimplantation: a single surgeon comparison to open surgery / J. L. Schomburg [et al.] // J. Pediatr. Urol. – 2014. – Vol. 10, N 5. – P. 875–879. https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2014.02.013

25. Outcomes of complex robot-assisted extravesical ureteral reimplantation in the pediatric population / A. M. Arlen [et al.] // J. Pediatr. Urol. – 2016. – Vol. 12, N 3. – P. 169.e1–169.e6. https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2015.11.007

26. Smith, R. P. Pediatric robotic extravesical ureteral reimplantation: comparison with open surgery / R. P. Smith, J. L. Oliver, C. A. Peters // J. Urol. – 2011. – Vol. 185, N 5. – P. 1876–1881. https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.12.072

27. Extravesical robot-assisted laparoscopic ureteral reimplantation for vesicoureteral reflux: initial experience in Japan with the ureteral advancement technique / Y. Hayashi [et al.] // Int. J. Urol. – 2014. – Vol. 21, N 10. – P. 1016–1021. https://doi.org/10.1111/iju.12483

28. Gundeti, M. S. Robot-assisted laparoscopic extravesical ureteral reimplantation: technique modifications contribute to optimized outcomes / M. S. Gundeti, W. R. Boysen, A. Shah // Eur. Urol. – 2016. – Vol. 70, N 5. – P. 818–823. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.065

References

1. Gregoir W. Congenital vesico-ureteral reflux. *Acta Urologica Belgica*, 1962, vol. 30, pp. 286–300.

2. Lich R., Howerton L. W., Davis L. A. Ureteral reflux, its significance and correction. *Southern Medical Journal*, 1962, vol. 55, no. 6, pp. 633–635. https://doi.org/10.1097/00007611-196206000-00020

3. Hendren W. H. Reoperation for the failed ureteral reimplantation. *Journal of Urology*, 1974, vol. 111, no. 3, pp. 403–411. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)59976-0

4. Daines S. L., Hodgson N. B. Management of reflux in total duplication anomalies. *Journal of Urology*, 1971, vol. 105, no. 5, pp. 720–724. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)61616-1

5. Zaontz M. R., Maizels M., Sugar E. C., Firlit C. F. Detrusorrhaphy: extravesical ureteral advancement to correct vesicoureteral reflux in children. *Journal of Urology*, 1987, vol. 138, no. 4, pt. 2, pp. 947–949. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)43466-5

6. Palmer J. S. Extravesical ureteral reimplantation: an outpatient procedure. *Journal of Urology*, 2008, vol. 180, no. 4S, pp. 1828–1831. https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.04.080

7. Ehrlich R. M., Gershman A., Fuchs G. Laparoscopic vesicoureteroplasty in children: initial case reports. *Urology*, 1994, vol. 43, no. 2, pp. 255–261. https://doi.org/10.1016/0090-4295(94)90058-2

8. Dubrov V. I., Bondarenko S. G., Kagantsov I. M. Modified single-sided laparoscopic extravesical antireflux operation. *Rossiiskii vestnik detskoi khirurgii, anesteziologii i reanimatologii* [Russian herald of pediatric surgery, anesthesiology and intensive care], 2018, vol. 8, no. 2, pp. 26–34 (in Russian).

9. Esposito C., Masieri L., Steyaert H., Escolino M., Cerchione R., Manna A., Cini C., Lendvay T. S. Robot-assisted extravesical ureteral reimplantation (revur) for unilateral vesico-ureteral reflux in children: results of a multicentric international survey. *World Journal of Urology,* 2018, vol. 36, no. 3, pp. 481–488. https://doi.org/10.1007/s00345-017-2155-9

10. Marchini G. S., Hong Y. K., Minnillo B. J., Diamond D. A., Houck C. S., Meier P. M., Passerotti C. C., Kaplan J. R., Retik A. B., Nguyen H. T. Robotic assisted laparoscopic ureteral reimplantation in children: case matched comparative study with open surgical approach. *Journal of Urology*, 2011, vol. 185, no. 5, pp. 1870–1875. https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.12.069

11. Kagantsov I. M., Sizonov V. V., Dubrov V. I., Bondarenko S. G., Shmyrov O. S., Akramov N. R., Pirogov A. V., Kulaev A. V., Svarich V. G. Laparoscopic resection of a bladder diverticulum in children. *Rossiiskii vestnik detskoi khirurgii, anesteziologii i reanimatologii* [Russian herald of pediatric surgery, anesthesiology and intensive care], 2019, vol. 9, no. 3, pp. 51–57 (in Russian).

12. Soulier V., Scalabre A. L, Lopez M., Li C.-Y., Thach S., Vermersch S., Varlet F. Laparoscopic vesico-ureteral reimplantation with Lich-Gregoir approach in children: medium term results of 159 renal units in 117 children. *World Journal of Urology*, 2017, vol. 35, no. 11, pp. 1791–1798. https://doi.org/10.1007/s00345-017-2064-y

13. Herz D., Fuchs M., Todd A., McLeod D., Smith J. Robotassisted laparoscopic extravesical ureteral reimplant: a critical look at surgical outcomes. *Journal of Pediatric Urology*, 2016, vol. 12, no. 6, pp. 402.e1–402.e9. https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2016.05.042

14. Kojima Y., Mizuno K., Umemoto Y., Yasui T., Hayashi Y., Kohri K. Ureteral advancement in patients undergoing laparoscopic extravesical ureteral reimplantation for treatment of vesicoureteral reflux. *Journal of Urology*, 2012, vol. 188, no. 2, pp. 582–587. https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.04.018

15. Lakshmanan Y., Fung L. C. Laparoscopic extravesicular ureteral reimplantation for vesicoureteral reflux: recent technical advances. *Journal of Endourology*, 2000, vol. 14, no. 7, pp. 589–594. https://doi.org/10.1089/08927790050152203

16. Barrieras D., Lapointe S., Reddy P. P., Williot P., McLorie G. A., Bägli D., Khoury A. E., Merguerian P. A. Urinary retention after bilateral extravesical ureteral reimplantation: does dissection distal to the ureteral orifice have a role? *Journal of Urology*, 1999, vol. 162, no. 3, pt. 2, pp. 1197–2000.

17. Fung, L. C., McLorie, G. A., Jain, U., Khoury, A. E., Churchill, B. M. Voiding efficiency after ureteral reimplantation: a comparison of extravesical and intravesical techniques. *Journal of Urology*, vol. 153, no. 6, pp. 1972–1975. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(01)67381-6

18. Minevich E., Aronoff D., Wacksman J., Sheldon C. A. Voiding dysfunction after bilateral extravesical detrusorrhaphy. *Journal of Urology*, 1998, vol. 160, no. 3, pt. 2, pp. 1004–1006. https://doi.org/10.1097/00005392-199809020-00010

19. Leissner J., Allhoff E. P., Wolff W., Feja C., Höckel M., Black P., Hohenfellner R. The pelvic plexus and antireflux surgery: topographical findings and clinical consequences. *Journal of Urology*, 2001, vol. 165, no. 5, pp. 1652–1655. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(05)66384-7

20. Yucel S., Baskin L. S. Neuroanatomy of the ureterovesical junction: clinical implications. *Journal of Urology*, 2003, vol. 170, no. 3, pp. 945–948. https://doi.org/10.1097/01.ju.0000082728.20298.ac

21. Tsai Y. C., Wu C. C., Yang S. S. Minilaparoscopic nerve-sparing extravesical ureteral reimplantation for primary vesicoureteral reflux: a preliminary report. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques. Part A*, 2008, vol. 18, no. 5, pp. 767–770. https://doi.org/10.1089/lap.2007.0241

22. Riquelme M., Aranda A., Rodriguez C. Laparoscopic extravesical transperitoneal approach for vesicoureteral reflux. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques. Part A*, 2006, vol. 16, no. 3, pp. 312–316. https://doi.org/10.1089/lap.2006.16.312

23. Peters C. A. Robotically assisted surgery in pediatric urology. *Urologic Clinics of North America*, 2004, vol. 31, no. 4, pp. 743–752. https://doi.org/10.1016/j.ucl.2004.06.007

24. Schomburg J. L., Haberman K., Willihnganz-Lawson K. H., Shukla A. R. Robot-assisted laparoscopic ureteral reimplantation: a single surgeon comparison to open surgery. *Journal of Pediatric Urology*, 2014, vol. 10, no. 5, pp. 875–879. https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2014.02.013

25. Arlen A. M., Broderick K. M., Travers C., Smith E. A., Elmore J. M., Kirsch A. J. Outcomes of complex robot-assisted extravesical ureteral reimplantation in the pediatric population. *Journal of Pediatric Urology*, 2016, vol. 12, no. 3, pp. 169.e1–169.e6. https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2015.11.007

26. Smith R. P., Oliver J. L., Peters C. A. Pediatric robotic extravesical ureteral reimplantation: comparison with open surgery. *Journal of Urology*, 2011, vol. 185, no. 5, pp. 1876–1881. https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.12.072

27. Hayashi Y., Mizuno K., Kurokawa S., Nakane A., Kamisawa H., Nishio H., Moritoki Y., Tozawa K., Kohri K., Kojima Y. Extravesical robot-assisted laparoscopic ureteral reimplantation for vesicoureteral reflux: initial experience in Japan with the ureteral advancement technique. *International Journal of Urology*, 2014, vol. 21, no. 10, pp. 1016–1021. https://doi.org/10.1111/iju.12483

28. Gundeti M. S., Boysen W. R., Shah A. Robot-assisted laparoscopic extravesical ureteral reimplantation: technique modifications contribute to optimized outcomes. *European Urology*, 2016, vol. 70, no. 5, pp. 818–823. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.065

Информация об авторах

Дубров Виталий Игоревич – канд. мед. наук, заведующий отделением. 2-я городская детская клиническая больница (ул. Нарочанская, 17, 220020, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dubroff2000@mail.ru

Строцкий Александр Владимирович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: astrotsky@mail.ru

Information about the authors

Vitaly I. Dubrov – Ph. D. (Med.), Head of the Department. 2nd City Children Clinical Hospital (17, Narochanskaya Str., 220020, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dubroff2000@mail.ru

Alexandr V. Strotsky – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: astrotsky@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.98-079.3:578.834.1(045)
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-437-443

Поступила в редакцию 13.07.2020
Received 13.07.2020

Т. В. Амвросьева[1], Н. В. Поклонская[1], И. В. Бельская[1], З. Ф. Богуш[1], О. Н. Казинец[1], Л. А. Анисько[2], Т. А. Рогачева[2], Ю. Б. Колтунова[1]

[1]Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь
[2]Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Республика Беларусь

ПОКАЗАТЕЛИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

Аннотация. В работе проанализированы данные о частоте обнаружения вирусспецифических антител (АТ) у пациентов с COVID-19, сроках их появления и кинетике сероконверсии. Так, суммарные АТ к коронавирусу SARS-CoV-2 были обнаружены у 55,7 % пациентов, а IgG – у 74,7 % лиц с лабораторно подтвержденной инфекцией COVID-19. Частота их выявления была достоверно выше, чем в других группах обследованных. В течение первых 6 сут кинетика сероконверсии характеризовалась появлением суммарных АТ и IgG у 10,5 и 5,3 % пациентов с COVID-19 соответственно. У большинства заболевших (71,4 %) сероконверсию IgM и IgG регистрировали в период с 7-х по 11-е сутки, а к 22-м суткам суммарные АТ и IgG были обнаружены у 100 % пациентов.

Представленные в работе результаты дополняют накопленные в разных странах мира данные, касающиеся формирования гуморального иммунного ответа при COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, коронавирус SARS-CoV-2, гуморальный иммунитет, антитело, иммуноглобулин M, иммуноглобулин G

Для цитирования: Показатели гуморального иммунитета у пациентов с COVID-19 / Т. В. Амвросьева [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 437–443. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-437-443

Tamara V. Amvrosieva[1], Natallia V. Paklonskaya[1], Inna V. Belskaya[1], Zoya F. Bohush[1], Olga N. Kazinetz[1], Ludmila A. Anisko[2], Tamara A. Rogacheva[2], Yulia B. Koltunova[1]

[1]Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus
[2]City Clinical Infectious Hospital, Minsk, Republic of Belarus

INDICATORS OF HUMORAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH COVID-19

Abstract. The presented work contains the analysis of a virus-specific antibody frequency in patients with COVID-19, the timing of their appearance and the kinetics of seroconversion. It was found that total antibodies to SARS-CoV-2 coronavirus were detected in 55.7 % and IgG – in 74.7 % of patients with laboratory-confirmed COVID-19 infection. Their frequency was significantly higher than that in patients of the other examined groups. During the first 6 days, the kinetics of seroconversion was characterized by the appearance of total antibodies and IgG in 10.5 and 5.3 % of patients with COVID-19, respectively. In most patients (71.4 %), seroconversion of IgM and IgG was registered from 7 to 11 days and 100 % of patients had total antibodies and IgG to SARS-CoV-2 after 22 days of disease.

The presented results complement the data accumulated in different countries of the world regarding the formation of a humoral immune response in COVID-19.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2 coronavirus, humoral immunity, antibody, immunoglobulin M, immunoglobulin G

For citation: Amvrosieva T. V., Paklonskaya N. V., Belskaya I. V., Bohush Z. F., Kazinetz O. N., Anisko L. A., Rogacheva T. A., Koltunova Yu. B. Indicators of humoral immunity in patients with COVID-19. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 437–443 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-437-443

Введение. Пандемия, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2, явилась самой серьезной биологической угрозой, с которой столкнулось человечество за последние десятилетия. Число заразившихся коронавирусом в мире превысило 38 млн, умерли более 1 млн человек, при этом число новых заболевших продолжает расти. В этих условиях мероприятия, направленные на профилактику и снижение числа зараженных, являются первоочередной задачей медицинской науки и практики. Для разработки и осуществления таких мероприятий критически важно обладать достаточным объемом информации о биологических свойствах нового вируса и характеристиках вызываемого им инфекционного процесса.

Изучение особенностей гуморального иммунного ответа организма на инфекцию, вызванную коронавирусом SARS-CoV-2, является сегодня одним из приоритетных направлений исследований практически во всех странах мира. В настоящее время интенсивно ведутся работы по созданию различных диагностических наборов для выявления основных классов антител (АТ) к коронавирусу SARS-CoV-2 и максимально широко проводятся их испытания.

С учетом текущего момента в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в кратчайшие сроки создана линейка наборов реагентов для выявления иммуноглобулинов М (IgM) и G (IgG), а также суммарных АТ (IgM, IgG, IgA) к короновирусу SARS-CoV-2 иммуноферментным методом (ИФА). В основе созданных диагностических наборов лежат современные биотехнологии, позволяющие оперативно (в течение 3–4 ч) обнаружить основные классы АТ, вырабатываемых в зараженном организме человека и определяющих его гуморальный иммунитет. Главный компонент наборов – антиген нового коронавируса SARS-CoV-2 – был получен специалистами центра генно-инженерным путем, что позволило значительно снизить, по сравнению с импортными аналогами, их конечную цену и стоимость серологического тестирования в целом.

Цель работы – установить частоту обнаружения вирусспецифических антител у пациентов с COVID-19, сроки их появления и кинетику сероконверсии с помощью разработанных нами диагностических наборов, основным компонентом которых является антиген нового коронавируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы исследования. Исследовано 1105 проб сывороток крови от 650 пациентов, в том числе 899 образцов от 474 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, находившихся на стационарном лечении в УЗ «Городская инфекционная клиническая больница» г. Минска (группа 1), 69 проб от 62 контактных лиц первого уровня (группа 2), 35 образцов от 33 пациентов с ранее перенесенными респираторными инфекциями (ОРИ, ОРВИ) неустановленной этиологии, у которых РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена с помощью ПЦР (группа 3). Исследовано также 45 проб от 45 условно здоровых лиц, у которых за последнее время не было признаков респираторной инфекции (группа 4).

Суммарные АТ, IgM и IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 выявляли с помощью метода ИФА, используя «Набор реагентов для выявления суммарных АТ (IgA, IgM, IgG) к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «SARS-CoV-2-рекИФА-АТ», «Набор реагентов для выявления иммуноглобулинов М к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «SARS-CoV-2-NP-ИФА-М» и «Набор реагентов для выявления иммуноглобулинов G к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «SARS-CoV-2-NP-ИФА-G» (производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь). При постановке реакции руководствовались инструкциями производителя.

Доверительные интервалы долей рассчитывали по распределению Пуассона через χ^2.

Результаты и их обсуждение. Согласно результатам проведенных серологических исследований методом ИФА, направленных на выявление АТ к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотке крови, частота обнаружения суммарных иммуноглобулинов М, G и А у пациентов с COVID-19 (группа 1) составила 55,7 % (95 % ДИ – 49,18; 62,84), у контактов первого уровня (группа 2) – 8,3 (95 % ДИ – 2,71; 19,45), у пациентов с ОРИ, ОРВИ неустановленной этиологии (группа 3) – 6,1 (95 % ДИ – 0,73; 21,89), у условно здоровых лиц без признаков респираторной инфекции (группа 4) – 10,4 % (95 % ДИ – 3,38 %; 24,31 %) (рис. 1). При этом частота детекции IgG в группах 1, 2, 3 оказалась на уровне 74,7 % (95 % ДИ – 61,48 %; 89,84 %), 13,3 % (95 % ДИ – 1,61 %; 48,16 %) и 23,5 % (95 % ДИ – 6,41 %; 60,24 %) соответственно. Проведенный статистический анализ показал, что доля пациентов с подтвержденной инфекцией COVID-19, в крови которых обнаружены суммарные АТ и/или IgG к коронавирусу SARS-CoV-2, достоверно выше, чем в других группах обследованных. Что касается противовирусных IgM, то в группе пациентов с COVID-19 данный маркер составил 29,3 % (95 % ДИ – 21,31; 39,38); у контактных лиц первого уровня –13,3 (95 % ДИ – 1,61; 48,16); у пациентов с ОРИ, ОРВИ неустановленной этиологии – 11,8 % (95 % ДИ – 1,42; 42,5). При этом статистически достоверные различия по присутствию антивирусных IgM у пациентов с COVID-19 и пациентов других групп отсутствовали.

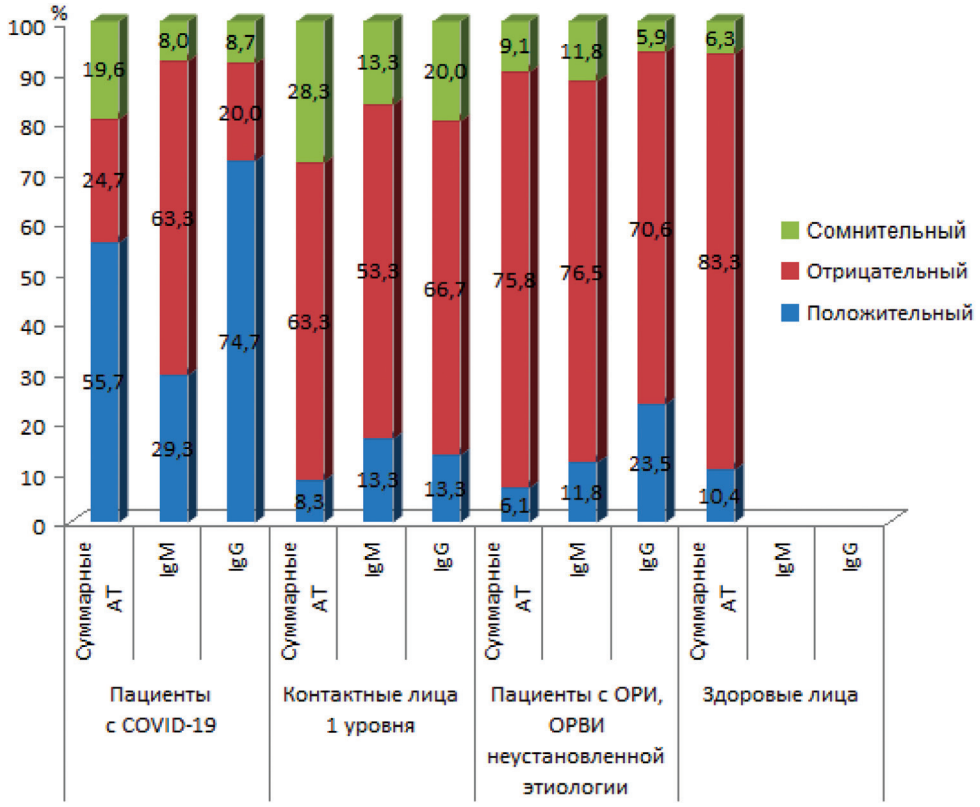


Рис. 1. Частота обнаружения антител к коронавирусу SARS-CoV-2 у пациентов разных групп

Fig. 1. Detection frequency of antibodies to coronavirus SARS-CoV-2 in patients of different groups

При более детальном изучении частоты выявления разных классов антиSARS-CoV-2 иммуноглобулинов у одних и тех же пациентов с COVID-19 (группа 1) чаще всего обнаруживались или только IgG (35,1 %), или оба класса АТ – IgM + IgG (20,4 %), изолированные IgM выявлялись крайне редко – всего у 1,6 % пациентов (рис. 2). У 26,1 % обследованных сероконверсия не выявлена (ни IgM, ни IgG не обнаружены). У 14,3 % пациентов этой группы был получен неопределенный результат по одному или обоим классам АТ (M, G), что могло свидетельствовать о самом начале сероконверсии. При этом в одних случаях у большинства пациентов выявлялся IgG, а результат на наличие IgM был неопределенным (4,9 %), в других – при детекции IgG результат был неопределенным, а IgM не обнаруживался (4,1 %).

Для изучения кинетики сероконверсии разных классов противовирусных АТ (суммарных, IgM, IgG) были проведены исследования сывороток крови от 45 пациентов с SARS-CoV-2 пневмонией, взятых в динамике развития заболевания на 0–6, 7–11, 12–15 и 16–22-е сутки от начала клинических симптомов (рис. 3).

Установлено, что в первые 6 сут с момента появления симптомов в данной группе обследуемых (n = 45) IgM не выявлялись, тогда как IgG обнаружились у 5,3 %, а суммарные АТ – у 10,5 % пациентов. В течение последующих 7–11 сут сероконверсия IgM и IgG была зарегистрирована у 71,4 % обследованных, а суммарные АТ обнаруживались только у 56,3 % пациентов. Исследования, проведенные в период с 12-х по 15-е сутки заболевания, показали дальнейший рост доли пациентов с сероконверсией IgG и суммарных АТ – до 92,9 и 83,8 % соответственно. При этом доля пациентов, у которых выявлялись IgM, составила 53,8 %. В период с 16-х по 22-е сутки сероконверсия IgG и суммарных АТ зарегистрирована у 100 % пациентов, тогда как IgM были обнаружены только у 62,5 % обследованных.

Таким образом, в группе пациентов с SARS-CoV-2 пневмонией частота выявления АТ в первую неделю с момента появления симптомов была низкой (5,3–10,5 %), сероконверсия IgM регистрировалась одновременно с IgG и суммарными АТ или в более поздние сроки. Частота

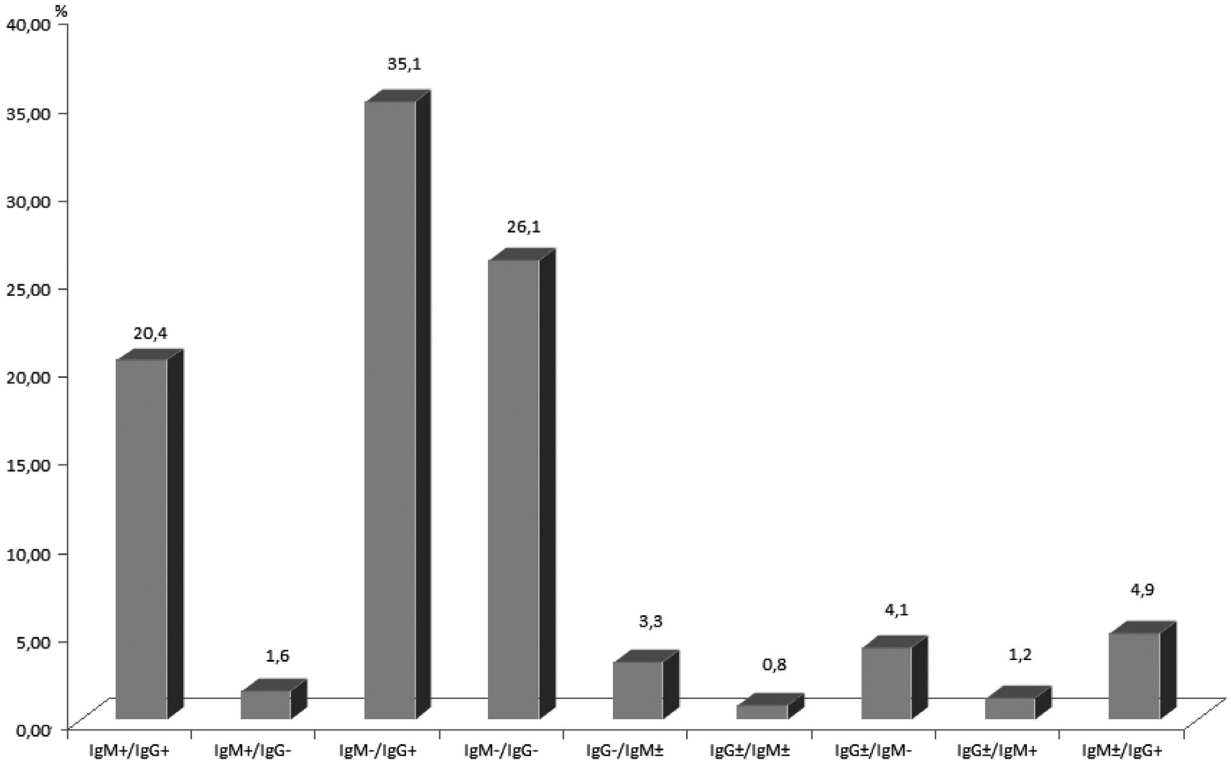


Рис. 2. Результаты детекции IgM/IgG у пациентов с COVID-19

Fig. 2. Results of IgM/IgG detection in patients with COVID-19

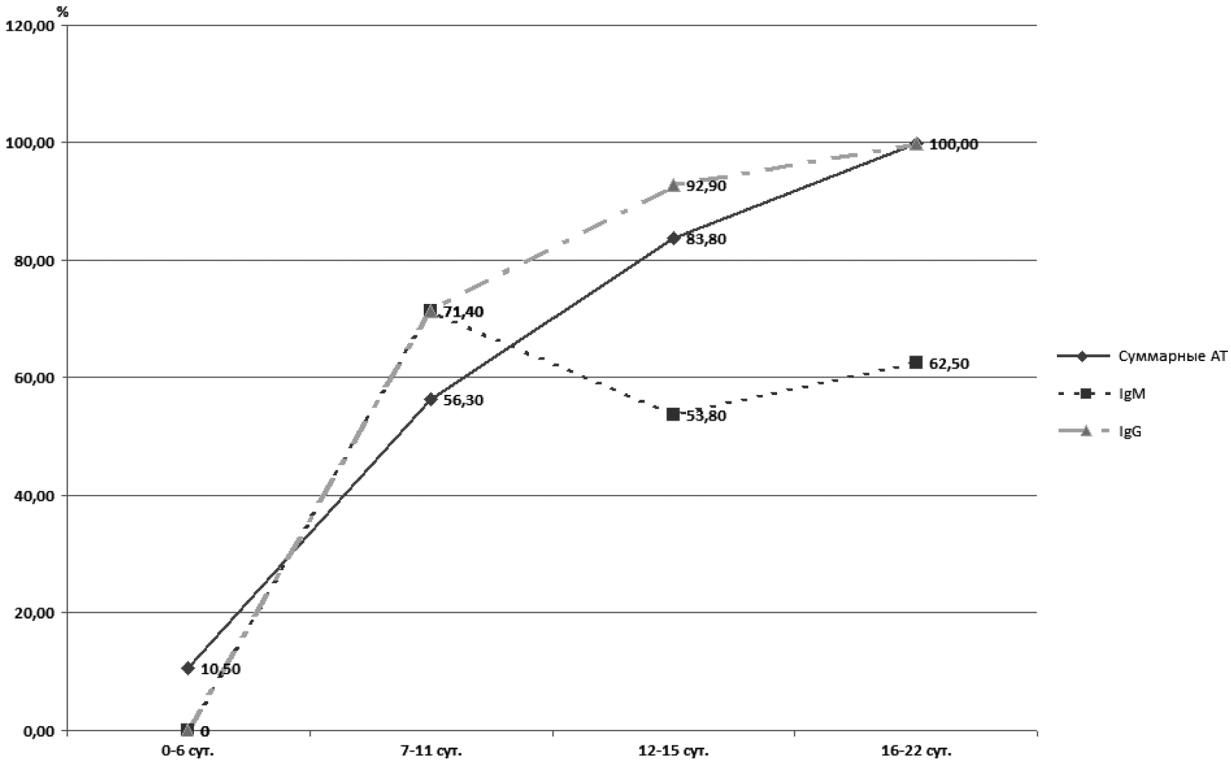


Рис. 3. Кинетика сероконверсии у пациентов с COVID-19

Fig. 3. Kinetics of seroconversion in patients with COVID-19

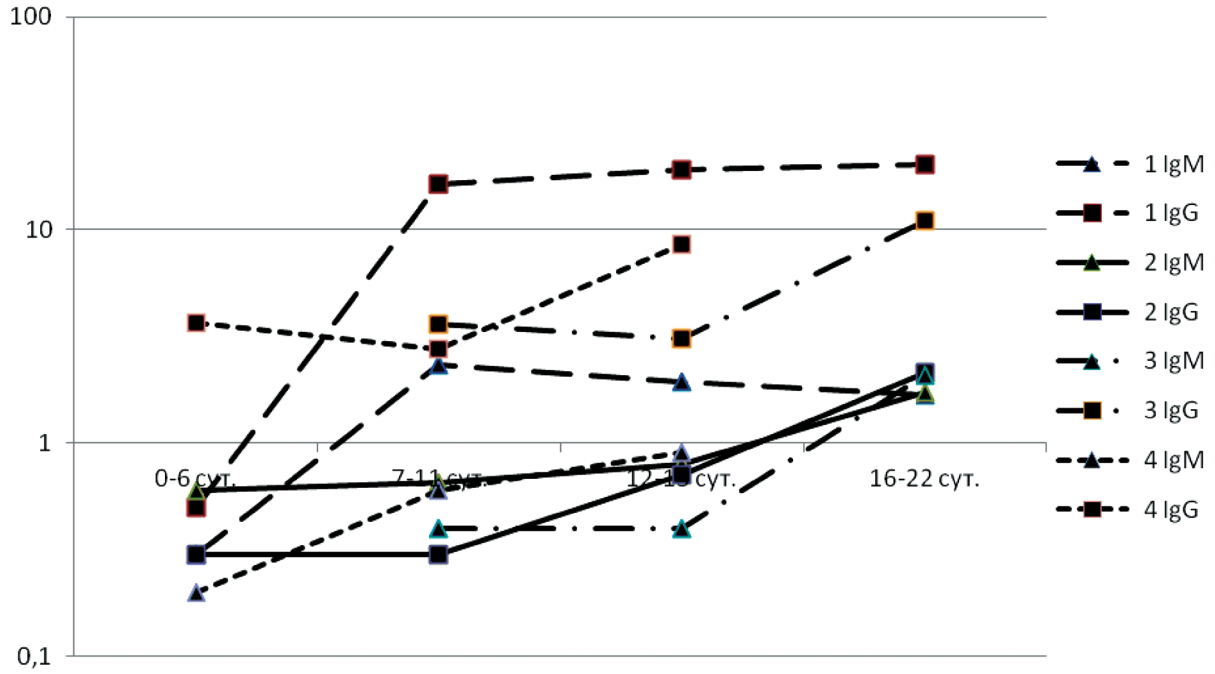


Рис. 4. Изменения коэффициента позитивности различных классов антител, отражающие кинетику сероконверсии у 4 пациентов с COVID-19

Fig. 4. Changes in the coefficient of positivity of various classes of antibodies, reflecting the kinetics of seroconversion in 4 patients with COVID-19

выявления IgM оказалась меньше по сравнению с таковой IgG и суммарных АТ и не достигала 100 % даже на 16–22-е сутки от начала заболевания.

Полученные результаты согласуются с имеющимися на сегодняшний день данными литературы. Так, по результатам мета-анализа большого количества проведенных исследований, представленного в Кокрейновском обзоре, частота обнаружения любых классов АТ (IgA, IgM, IgG) в любых сочетаниях у пациентов с COVID-19 в течение первых 7 сут после появления симптомов не превышала 30,1 %, а чувствительность выявления IgG была максимальной по сравнению с другими классами АТ [1].

В качестве примера различной кинетики сероконверсии у 4 наблюдаемых нами пациентов с COVID-19 в динамике развития инфекционного процесса на рис. 4 приведены значения коэффициента позитивности, отражающего концентрацию вирусспецифических АТ. У одного из них (пациент № 4) в первые 6 сут инфекции были обнаружены IgG, концентрация которых постепенно увеличивалась к 12–15-м суткам, тогда как для IgM коэффициент позитивности так и не превысил пороговых значений (получены повторные отрицательные результаты). У второго пациента (№ 1) до 6-х суток манифестной инфекции был получен отрицательный результат как по IgM, так и по IgG. В период с 7-х по 11-е сутки у него произошла сероконверсия IgM и IgG, после чего концентрация АТ сохранялась высокой с незначительным ростом IgG и незначительным снижением IgM. У третьего пациента (№ 2) также наблюдалась одновременная сероконверсия IgM и IgG, однако в значительно более поздние сроки – на 16–22-е сутки с момента заболевания. Четвертый пациент (№ 3) имел положительный результат по IgG на 7–11-е сутки с постепенным нарастанием их концентрации, тогда как сероконверсия IgM у него произошла только на 16–22-е сутки заболевания.

Заключение. В настоящей работе изложены и проанализированы впервые полученные в нашей стране результаты серологических исследований, демонстрирующие особенности развития гуморального иммунного ответа на коронавирус SARS-CoV-2.

Установлено, что у лиц с лабораторно подтвержденной инфекцией COVID-19 частота выявления суммарных АТ и IgG к ее возбудителю составила 55,7 и 74,7 % соответственно, что было

достоверно выше, чем у пациентов других обследуемых групп. По частоте обнаружения IgM такие достоверные различия отсутствовали.

Кинетика сероконверсии разных классов анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов у пациентов с COVID-19 характеризовалась появлением суммарных АТ (у 10,5 %) и IgG (у 5,3 %) в течение первых 6 сут с момента регистрации симптомов заболевания. У большинства обследованных (71,4 %) сероконверсия IgM и IgG произошла с 7-х по 11-е сутки, а к 22-м суткам суммарные АТ и IgG были обнаружены у 100 % пациентов.

Анализ полученных результатов показал необходимость учета особенностей инфекционного процесса, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2. Так, установлено, что РНК возбудителя можно выявить в образцах биологического материала в первые дни после заражения, в том числе за несколько дней до появления клинических симптомов болезни и вплоть до 14-х суток с момента его попадания в организм. Начиная с 3–4-х суток после инфицирования происходит выработка специфических противовирусных АТ, уровень которых в крови становится детектируемым после 5–8 сут с момента появления симптомов заболевания [2]. В данные сроки детекция РНК возбудителя наименее эффективна. В этих условиях изучение показателей гуморального противовирусного иммунитета имеет особо важное значение для установления этиологии заболевания.

Представленные в работе результаты дополняют накопленные в разных странах мира данные, касающиеся формирования гуморального иммунного ответа при COVID-19. Так, рядом исследователей показано, что появление противовирусных АТ классов M и G происходит практически одновременно (ранее такая же особенность сероконверсии была установлена для коронавируса SARS-CoV) или последовательно, с интервалом в 2–3 дня [3]. При этом у одних пациентов вначале появляются IgM, а у других – IgG, что согласуется с представленными в настоящем исследовании данными. Полученные нами результаты совпадают также с информацией зарубежных коллег, касающейся кинетики антителообразования и достижения сероконверсии у 100 % пациентов с COVID-19 на 16–22-е сутки, которая происходит на фоне снижения IgM [4].

Обсуждая диагностическую значимость серологических показателей, следует отметить, что большинством исследователей раздельное определение IgM и IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 признается сегодня менее оправданным, так как результативность детекции суммарных АТ превышает таковую при определении отдельных классов противовирусных иммуноглобулинов [5]. При этом обнаружение изолированных IgM у пациентов характеризуется более низкой чувствительностью [6], а также может приводить к получению ложноположительных результатов [7], поскольку IgM обладают лабильностью и относительно более низкой специфичностью по сравнению с другими классами противовирусных иммуноглобулинов. Полученные нами результаты согласуются с мнением ведущих специалистов и указывают на более высокую диагностическую эффективность выявления суммарных АТ (IgM, IgG, IgA) и/или IgG при обследовании пациентов с COVID-19 начиная с 8–14-х суток после появления клинических симптомов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2 / J. J. Deeks [et al.] // Cochrane Database System. Rev. – 2020. – Vol. 6. https://doi.org/10.1002/14651858.cd013652

2. Serological approaches for COVID-19: epidemiologic perspective on surveillance and control / Ch. Y.-P. Lee [et al.] // Front. Immunol. – 2020. – Vol. 11. – Art. 879. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00879

3. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 / Q.-X. Long [et al.] // Nat. Med. – 2020. – Vol. 26, N 6. – P. 845–848. https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1

4. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis / Z. Li [et al.] // J. Med. Virol. – 2020. – Vol. 92, N 9. – P. 1518–1524. https://doi.org/10.1002/jmv.25727

5. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset / B. Lou [et al.] // Eur. Resp. J. – 2020. https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20041707

6. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019 / Y. Jin [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2020. – Vol. 94. – P. 49–52. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.065

7. A method to prevent SARS-CoV-2 IgM false positives in gold immunochromatography and enzyme-linked immunosorbent assays / Q. Wang [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2020. – Vol. 58, N 6. https://doi.org/10.1128/jcm.00375-20

References

1. Deeks J. J., Dinnes J., Takwoingi Y., Davenport Cl., Spijker R., Taylor-Phillips S. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020, vol. 6. https://doi.org/10.1002/14651858.cd013652

2. Lee Ch. Y.-P., Lin R. T. P., Renia L., Ng L. F. P. Serological approaches for COVID-19: epidemiologic perspective on surveillance and control. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 11, art. 879. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00879

3. 3. Long Q.-X., Liu B.-Z., Deng H.-J., Wu G.-Ch., Deng K., Chen Y.-K. [et al.]. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 2020, vol. 26, no. 6, pp. 845–848. https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1

4. Li Z., Yi Y., Luo X., Xiong N., Liu Y., Li S. [et al.]. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology*, 2020, vol. 92, no. 9, pp. 1518–1524. https://doi.org/10.1002/jmv.25727

5. Lou B., Li T., Zheng S., Su Y., Li Z., Liu W. [et al.]. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. *Infectious European Respiratory Journal*, 2020. https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20041707

6. Jin Y., Wang M., Zuo Z., Fan C., Ye F., Cai Z., Wang Y., Cui H., Pan K., Xu A. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, vol. 94, pp. 49–52. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.065

7. Wang Q., Du Q., Guo B., Mu D., Lu X., Ma Q. [et al.]. A method to prevent SARS-CoV-2 IgM false positives in gold immunochromatography and enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, vol. 58, no. 6. https://doi.org/10.1128/jcm.00375-20

Информация об авторах

Амвросьева Тамара Васильевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: amvrosieva@gmail.com

Поклонская Наталья Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com

Бельская Инна Валерьевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com

Богуш Зоя Федоровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com

Казинец Ольга Николаевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com

Анисько Людмила Александровна – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Городская клиническая инфекционная больница г. Минска (ул. Кропоткина, 76, 220002, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: luidok@mail.ru

Рогачева Тамара Альбертовна – канд. мед. наук, врач лабораторной диагностики. Городская клиническая инфекционная больница г. Минска (ул. Кропоткина, 76, 220002, г. Минск, Республика Беларусь).

Колтунова Юлия Борисовна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com

Information about the authors

Tamara V. Amvrosieva – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: amvrosieva@gmail.com

Natallia U. Paklonskaya – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com

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

Zoya F. Bohush – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com

Olga N. Kazinetz – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com

Ludmila A. Anisko – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. City Clinical Infectious Hospital (76, Kropotkin Str., 220002, Minsk, Republic of Belarus).

Tamara A. Rogacheva – Ph. D. (Med.), Doctor of Laboratory Diagnostics. City Clinical Infectious Hospital (76, Kropotkin Str., 220002, Minsk, Republic of Belarus).

Yulia B. Koltunova – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
UDC 616.311.2-073.756.8-08:602.9-092.4-036.8
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-444-451 Received 19.05.2020

Sergey P. Rubnikovich[1], Sergey V. Sirak[2], Yuliya L. Denisova[1], Vasilina A. Andreeva[3], Elena V. Kuzmenko[3], Tatiana E. Vladimirskaya[3], Ilya S. Khomich[3], Igor D. Volotovsky[4]

[1]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[2]Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation
[3]Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus
[4]Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MORPHOLOGICAL CHANGES IN PERIODONTAL TISSUES IN LABORATORY ANIMALS USING MESENCHYMAL STEM CELLS

Abstract. The article presents the analysis of the morphological changes of the periodontal tissues of laboratory animals using mesenchymal stem cells (MSCs).

The goal of the study is to create a model of experimental periodontitis and to identify the characteristics of morphological changes in the periodontal tissues using a biomedical cell product based on the allogeneic adipose tissue of MSCs (AT MSCs).

The application of a mixture of AT MSCs and osteoinduced AT MSCs (in the ratio of 1:1) allows reducing the time of bone defect regeneration in comparison to that of bone tissue regeneration when AT MSCs and osteoinduced AT MSCs are used separately, which is expressed in the filling of the bone defect with a fibroreticular osteogenic tissue, as well as with a muscle tissue one month after surgery.

In 2 months, in the defect area filled with a collagen membrane with a mixture of AT MSCs and osteoinduced AT MSCs, the initial signs of the formation of trabecula of bones were detected, which is evident of a more comprehensive osteosynthesis process compared to the blood clot use.

Keywords: mesenchymal stem cells, periodontitis, morphometry, fibroreticular tissue

For citation: Rubnikovich S. P., Sirak S. V., Denisova Yu. L., Andreeva V. A., Kuzmenko E. V., Vladimirskaya T. E., Khomich I. S., Volotovsky I. D. Morphological changes in periodontal tissues in laboratory animals using mesenchymal stem cells. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 444–451. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-444-451

С. П. Рубникович[1], С. В. Сирак[2], Ю. Л. Денисова[1], В. А. Андреева[3], Е. В. Кузьменко[3], Т. Э. Владимирская[3], И. С. Хомич[3], И. Д. Волотовский[4]

[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
[2]Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Российская Федерация
[3]Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь
[4]Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ПЕРИОДОНТА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Аннотация. В статье приведены результаты исследования морфологических изменений в тканях периодонта лабораторных животных при использовании мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Цель исследования – разработать модель экспериментального периодонтита и установить характер морфологических изменений в тканях периодонта при применении биомедицинского клеточного продукта на основе аллогенных МСК жировой ткани (МСК ЖТ).

Применение смеси МСК ЖТ и остеоиндуцированных МСК ЖТ в пропорции 1:1 позволяет сократить сроки регенерации костного дефекта по сравнению с длительностью восстановления костной ткани при применении МСК ЖТ, а также остеоиндуцированных МСК ЖТ, что выражается в заполнении дефекта костной ткани наряду с мышечной фиброретикулярной остеогенной тканью через 1 мес. после оперативного вмешательства. Через 2 мес. в зоне дефекта, заполненного коллагеновой мембраной со смесью МСК ЖТ и остеоиндуцированных МСК ЖТ, выявлены признаки начала формирования костных балок, что свидетельствует о более полноценном остеосинтезе, чем при заживлении под кровяным сгустком.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, периодонтит, морфометрия, фиброретикулярная ткань

Для цитирования: Морфологические изменения в тканях периодонта лабораторных животных при применении мезенхимальных стволовых клеток / С. П. Рубникович [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 444–451 (*на англ.*). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-444-451

Introduction. Periodontal diseases are among the leading dental diseases across the world [1, 2]. The character of the inflammatory process during periodontal diseases, the disease progression and turning chronic lead to significant pathological changes in the periodontal tissues, the loss of teeth and dysfunctions of the dentition system as well as of various associated organs and systems of the human body [3]. Although measures have been developed for prevention and treatment of this pathology, there is no obvious trend towards the reduction of these diseases in patients of all age groups [2]. Therefore, the issues of efficacious treatment of periodontal diseases and prevention of the associated complications remain relevant.

The inflammatory process in the periodontal tissues is destructive and accompanied by the resorption of the bone tissues and the damage of the periodontium that supports and maintains the tooth [3]. Given a weak reparative capacity of these structures, the restoration of the bone deficiency by means of physiological regeneration takes a long time and can be complete in rare cases [4, 5]. Hence, one of the directions for comprehensive treatment is to improve surgery approaches for eliminating infectious destructive spots in the periodontium.

At present, the ability of periodontium tissues for regeneration by using different materials is actively investigated. It has been demonstrated that the method based on the use of membranes that limit the access to the regeneration space of the epithelial cells and connective tissue of the gum, not involved in the construction of periodontal tissues, is very efficient [6]. However, although the membranes slow down the migration of the epithelial cells, they do not facilitate repopulation of the periodontium space with progenitor cells [7, 8]. In order to enhance the osteoinductive capacity, it is expedient to combine the use of membranes with regeneration stimulating agents. The current investigations demonstrate a high ability of adipose tissue mesenchymal stem cells (AT MSCs) to initiate and accelerate the regenerative processes in the periodontal tissues, as well as to secrete the factors stimulating the resident progenitor cells [9], which enhances the treatment efficacy significantly [8–10].

At present, investigations are conducted to identify the efficiency of application of cell technologies in various fields of medicine, including periodontology [11–17]. The scientific sources include evidence on the reduced propagation and intensity of the gingival recession [16, 18, 19] and on improvement of periodontium microcirculation processes when MSCs are used [17, 20–35].

The above proves the expediency of experimental clinical studies to justify the use of MSCs in dentistry in order to regenerate bone tissue and, consequently, to increase the efficacy of treatment of patients with periodontal diseases.

The goal of this study was to identify the character of morphological changes using a biomedical cell product based on adipose tissue mesenchymal stem cells.

Subjects and methods of study. This study was approved by the independent ethics committee of the State health institution "Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education" (BelMAPO). The experimental part of the study was performed by the pathophysiological group of the BelMAPO Research Laboratory in vivarium conditions complying with the requirements specified by Technical Code of Standard Practice 125-2008 "Good Laboratory Practice" and Sanitary Rules and Norms 2.1.2.12-18-2006 "Arrangement, Equipment and Maintenance of Experimental Biological Clinics (Vivaria)" [25].

Isolation and cultivation of allogenic AT MSCs from experimental animals (EAs), cell culture quality control, including the counting of the number and the assessing of the vitality of MSCs, determination of the cell phenotype using monoclonal antibodies, evaluation and control of contamination by microorganisms, as well as the induction of cell development in the osteogenic direction and evaluation of differentiation and immobilization of cells on the medium were performed in laboratory conditions in the state research institution "The Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus". A porous membrane based on type I bone collagen "Osteoplast" (produced by the "Vitaform", Russian Federation) was used as a biodegradable carrier for immobilization of MSCs.

Subjects of the study included 36 *Chinchilla* rabbits, both males and females, with the body weight 3.7 [3.5; 3.8] kg. The EAs were kept in conditions of vivarium according to the veterinary sanitary rules approved in the Republic of Belarus [25]. Before the experiment, the EAs had been observed in quarantine conditions in the vivarium for 2 weeks. The EAs were examined and weighed also on the day when the experiment commenced. Taking into consideration the chronobiological dependence of most biochemical processes in animals, the experiments were made at the same hours in the morning.

The EAs were anesthetized using one intramuscular injection of the Ketamine solution (50 mg/ml), 1 mg/kg body weight. Then anaesthesia was enhanced and maintained as needed during the surgery by means of a mixture of 0.05 Fentanyl solution and 0.25 % Droperidol solution (1:2). A cutter was used to produce in the anesthetized animals bone defects (BDs), 2 mm wide and 5 mm deep, in the area of the interradicular septum of the mandibular central incisors on the vestibular side.

The EAs were divided into 4 homogeneous groups: the control group (including 9 EAs) and 3 experimental groups (each including 9 EAs) according to the planned method of treatment. In the control group the artificial BD was filled with a blood clot; in group I with a porous membrane based on bone collagen with 50,000 allogenic AT MSCs immobilized on the membrane; in group II with a membrane with 50,000 immobilized allogenic osteoinduced AT MSCs; and in group III with a membrane including a mixture of 25,000 allogenic and 25,000 allogenic osteoinduced AT MSCs. After the BD was filled, the surgical wounds were closed (stitched).

During the postsurgical period, the EAs were observed to monitor the body weight, the condition of the visible mucous membranes, hair coat, motion activity, behaviour and the consumption of food and water.

After the observation was over, the control and experimental group animals were brought out from the experimental condition in compliance with the bioethical principles specified in the good laboratory practice standards (GLP).

Samples of periodontal bone were taken from mandible of the EAs, containing teeth and periodontal tissues.

The excised mandibular sections were fixed in 10 % neutral formalin for 48 hours. Decalcification was made using formic and hydrochloric acids, including mandatory control of decalcification by means of calcium oxalate. Then the mandibular sections were washed in a water stream for 24 hours and dewatered in alcohol of ascending concentrations (70, 80, 96 and absolute alcohol). This material was treated with alcohol-xylene, xylene, xylene-paraffin and poured into paraffin. The paraffin blocks were used to make cuts 3–5 μm thick, which were stained with haematoxylin and eosin according to Masson's protocol.

Morphometric analysis of histologic specimens was made under ×50 magnification. Each micro-specimen was investigated in 5 random fields of vision. The area of the field of vision was constant, making 4,561,048.00 μm^2. The area of fibroreticular tissue was determined. The obtained results were presented as the ratio of the area of fibroreticular tissue to the total area of the field of vision, expressed in percentage. The microspecimens were investigated and micro pictures were made by means of the microscopes Axio Imager (Zeiss, Germany) and DMLS with the software (Leica, Germany).

The obtained data were statistically processed using Statistica and Excel. The type of quantitative characteristics distribution was determined using the Shapiro-Wilk test. In order to describe the quantitative characteristics with normal distribution, it was required to specify the mean value and the root-mean-square deviation. The quantitative characteristics with the distribution different from the normal were described using the median (Me), the lower 25^{th} quintile (LQ) and the upper 75^{th} quantile (UQ). The Mann–Whitney test was used for group comparison. The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussions. ***The morphological pattern of bone tissue regeneration in the control group.*** On day 14, in animals from the control group healing under blood clot, a triangular BD was observed, separated from the maternal splenial bone by a thin strip of fibroreticular osteogenic tissue growing focally into the splenial bone (BD encapsulation). Loose oedema connective tissue (CT), muscular tissue (MT) and spots of granular tissue with local bleeding were observed in the BD lumen. Localized fibroreticular osteogenic tissue was observed in the BD bottom area. Hyperaemia of haversian canal vessels was observed in the splenial bone adjacent to the BD.

After 1 month, the BD retained the triangular shape with surface retraction and was separated from the maternal splenial bone by a thin strip of fibroreticular osteogenic tissue. The BD lumen included loose oedema CT with localized bleeding and cystic transformation. The surface section of the BD bottom area included necrotic CT, loose CT and dilated blood vessels. Localized formation of fibroreticular osteogenic tissue was observed. Hyperaemia of haversian canal vessels was seen in the splenial bone adjacent to the BD.

After 2 months, the BD had a circular wedge shape filled (two-thirds) with fibroreticular osteogenic tissue. Multiple spots of extensive bleeding were observed in the DB area. Necrotic tissue sports were seen

in the BD surface section. Focal aggregations of osteoblasts and fibroblasts were found in the BD bottom area. The adjacent area of the maternal bone included ectasia of vascular bone channels with fragmentation and elimination of their connective tissue component, and localized adipose transformation of the trabecular tissue.

The morphological pattern of bone tissue regeneration in group I. On day 14, a baggy BD with surface retraction filled with MT with dilated blood vessels and loose oedema CT were observed. Fragments of the stratified CT strip, separating the defect from the matrix bone, were observed in the CT surface section along the BD perimeter. Fragments collagen membrane, necrotic areas and a chondrification spot were found in the CT surface section. Islets of fibroreticular osteogenic tissue were found in the BD surface area. Constriction of the osteon channels and proliferation of the cell component were observed in the osseous tissue of the matrix bone.

After 1 month, a baggy CD was found, separated along the entire edge from the compact bone by an unevenly narrow strip of connective tissue. Muscular tissue with a small destruction spot and lymphoid cell infiltration were observed in the defect lumen. Segments of loose fibrous, granulated and compact fibroreticular tissue were observed in the bottom section. Localized hyperplasia of the trabecular CT was observed outside the BD area.

After 2 months, the BD was oval and surrounded unevenly by a narrow strip of connective tissue, delaminated from the compact bone (Fig. 1). Collagen membrane fragments as well as necrosis areas, as well as necrotic areas were identified in the BD surface section. Loose oedema CT and localized spots of fibroreticular osteogenic tissue were seen in the BD bottom area. Ectasia and hyperaemia of osteon channel vessels with loose perivascular tissue and hyperplasia of the cell component were observed in the perifocal splenial bone tissue.

The morphological pattern of bone tissue regeneration in group II. On day 14, the BD was oval and separated, along the edge, from the matrix bone by a thin strip of stratified loose fibrous or fibroreticular tissue. Loose fibrous immature CT with diapedesis bleeding was identified in the BD bottom area. The BD lumen was filled with MT and loose fibrous CT. Collagen membrane fragments were observed in the BD surface section. Ectasia and hyperaemia of osteon channel vessels were observed in the perifocal splenial bone tissue.

After 1 month, an oval BD, surrounded by a thin strip of stratified loose fibrous or fibroreticular tissue, was observed. Loose fibrous immature CT with diapedesis bleeding was found in the BD bottom area. The BD lumen was filled with MT and loose fibrous CT. Collagen membrane fragments were found in the BD surface section. Ectasia and hyperaemia of osteon channel vessels were observed in the perifocal splenial bone tissue.

After 2 months, the BS had an oval baggy shape and was separated from the matrix splenial bone by a narrow strip of loose CT in the surface section and fibroreticular in the bottom section (Fig. 2). The BD lumen was filled with oedema MT and had localized spots of bleeding. Fibroreticular osteogenic

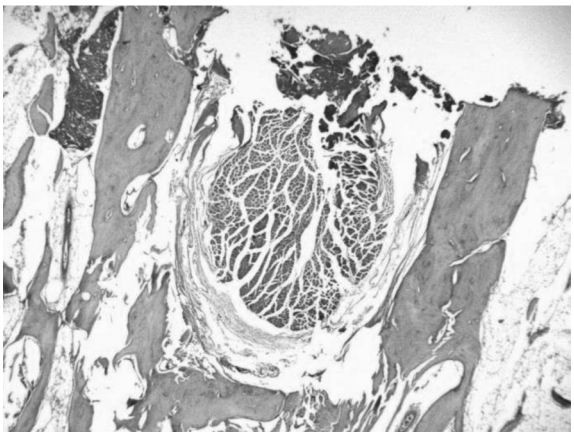


Fig. 1. The bone defect in 2 months. The collagen membrane with AT MSCs. Staining with haematoxylin and eosin, ×20

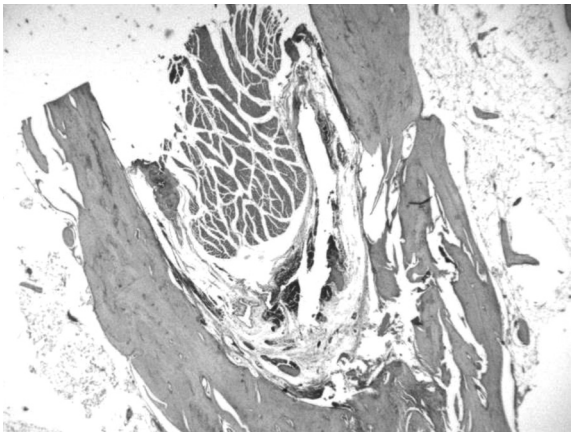


Fig. 2. The bone defect in 2 months. The collagen membrane with osteoinduced AT MSCs. Staining with haematoxylin and eosin, ×20

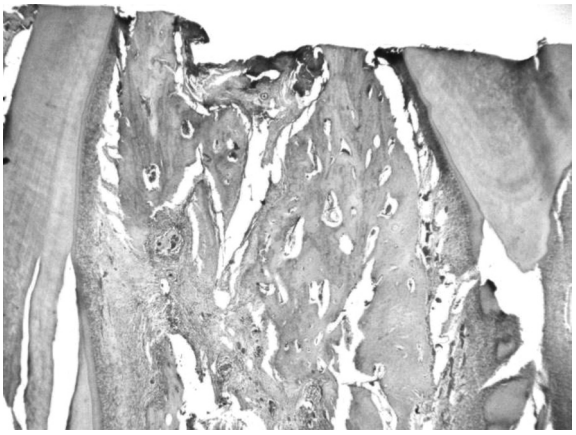


Fig. 3. The bone defect in 2 months. The collagen membrane with a mixture of AT MSCs and osteoinduced AT MSCs in the 1:1 ratio. Staining with haematoxylin and eosin, ×20.

tissue and localized sports of bleeding were observed in the bottom section. Osteogenic islets with rare osteoblasts on their surface were observed in the area of fibroreticular tissue. Some haversian channels of the bone matrix were diluted, and the vessels were hyperaemic.

The morphological pattern of bone tissue regeneration in group III. On day 14, a bag-shaped BD was observed. The splenial bone tissue defect was separated along the edge by a narrow strand of connective tissue, segmentally stratified, *inter alia*, in the BD bottom area. Small fragments of necrotic tissue were seen in the CT surface section. The entire BD lumen was filled with dystrophic muscle tissue, including a focal necrosis. A crosswise narrow strand of connective tissue with a focal necrosis and diapedesis bleeding, separating the BD from the lower splenial bone tissue, was found in the BD bottom area. The matrix bone included pyknotic osteocytes with spots of their necrosis.

After 1 month, a strip of fibroreticular osteogenic tissue was observed along the edge of the splenial bone tissue, separating the BD. The BD lumen included (in the surface section) fragments of small-cell or acellular homogeneous tissue with focal small-cell transformation, localized atrophic lymphoid tissue and, predominantly, areas of dystrophic muscular tissue with focal spots of necrosis. Spots of loose small-cell fibrous tissue and fibroreticular osteogenic tissue, chondrification focus, were seen in the BD bottom area. Extensive hyperaemia of the matrix bone haversian channels was observed.

After 2 months, a slightly slope and shallow BD was unevenly surrounded in some segments by a thin small-cell strip of fibroreticular osteogenic tissue (Fig. 3). Areas of fibroreticular osteogenic tissue with osteogenic islets and trabeculae of bone were observed in the BD lumen. Localized aggregations of osteoblasts and their high density were observed. The bone matrix of the matrix bone had a regular histologic structure, with wide hyperaemia of the matrix bone haversian channel vessels.

Morphometric investigation made it possible to identify that in experimental group III, where the collagen membrane mixture of AT MSCs and osteoinduced AT MSCs was used in the 1:1 ratio, the indicators of fibroreticular tissue area were definitely higher than in groups I and II ($p < 0.05$) (see Table). The maximum values of the osteogenic tissue area were identified in experimental group III throughout the experiment ($p < 0.05$) (Fig. 4).

Indices of fibroreticular tissue area (%) depending on the duration of the experiment

Group	Periods of observation		
	14 days	1 month	2 months
Control	1.65 (1.45; 1.82)	3.25 (3.25; 3.53)	5.19 (5.00; 5.33)
I	1.50 (1.35; 1.60)	2.28 (2.18; 2.36)	3.51 (3.30; 3.79)
II	2.24 (2.14; 2.34)	2.45 (2.23; 2.67)	1.70 (1.49; 1.92)
III	2.46 (2.30; 2.56)	6.10 (5.96; 6.30)	5.44 (5.12; 5.78)

Thus, the formation of the connective tissue capsule with areas of mature granulation tissue, fibroreticular tissue and small necrosis focal spots (BD encapsulation) were observed along the BD perimeter in the animals from the control and experimental groups. In the control group, the BD capsule comprised fibroreticular osteogenic tissue at every stage of observation. In the experimental groups, fibroreticular tissue capsules were observed in animals from groups II and III after 1 и 2 months of the experiment, and in animals from group I only in the bottom section after 2 months. After 2 months, the BD was filled with fibroreticular osteogenic tissue in animals from the control group and experimental group III; and osteogenic islets or emerging small trabeculae with a high density of osteoblasts on their surface were found in the fibroreticular

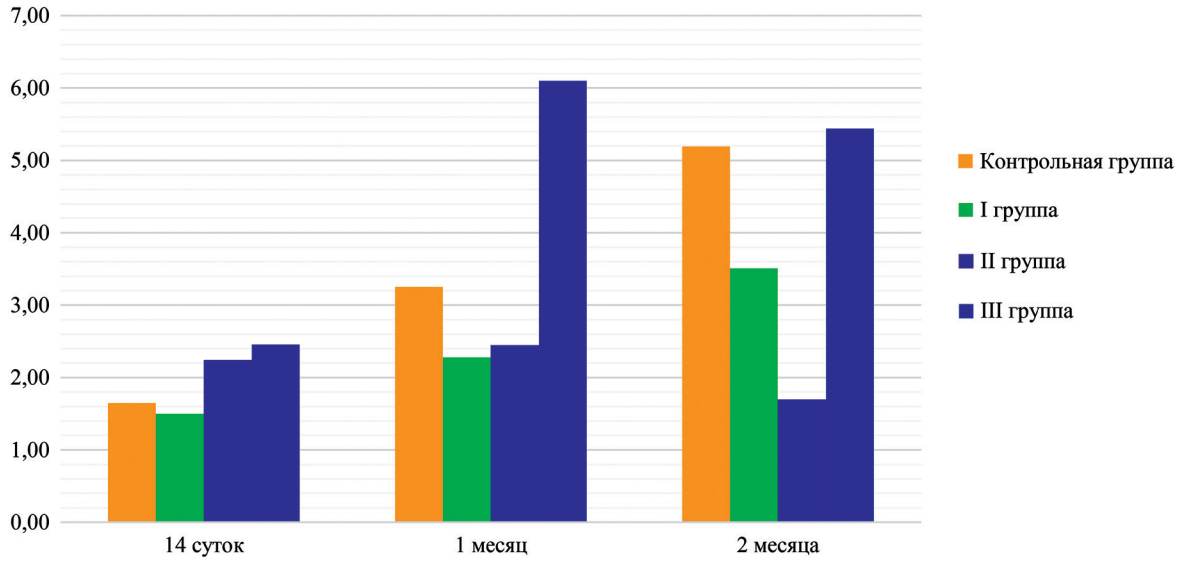


Fig. 4. The trends of the osteogenic tissue area indices, %. Left to right: control group, group I, group II, groups III; 14 days, 1 month, 2 months

tissue in animals from experimental group III in the BD bottom area. In animals from the control group, no trabeculae or osteogenic islets were identified in the BD bottom area two months later.

Conclusion. The developed model of experimental periodontitis reproduces signs of bone tissue pathology and shows that it can be used for evaluation of the regenerative processes.

The use of a collagen membrane with osteoinduced AT MSCs allows reducing the BD regeneration period as compared to the bone tissue regeneration period using AT MSCs, which is demonstrated by faster filling of the defect lumen, along with muscular tissue, by loose connective tissue with areas of fibroreticular osteogenic tissue, and by the formation of granulation spots and obvious vessel response of the bone defect tissue.

The use of a mixture of AT MSCs and osteoinduced AT MSCs in the 1:1 ratio reduces the time of bone defect regeneration compared to the time of bone tissue regeneration using osteoinduced AT MSCs, i. e., bone defect tissue was filled, along with muscular tissue, by fibroreticular osteogenic tissue one month after the surgery intervention. After 2 months, the area of the defect, filled by a collagen membrane with the mixture of AT MSCs and osteoinduced AT MSCs in the 1:1 ratio, demonstrated signs of generation of the trabecula of bone, indicating a more comprehensive osteosynthesis than in the case of healing under a blood clot.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dedova L. N., Denisova Yu. L., Kandrukevich O. V., Solomevich A. S., Rosenik N. I. The prevalence of periodontal disease, tooth root caries, dentin sensitivity and dentofacial deformities in the Republic of Belarus according to the results of a population survey in the groups aged 35–44, 45–54 and 55–64 years. *Stomatolog* [Stomatologist], 2016, no. 1, pp. 6–53 (in Russian).

2. Reich E. Trends in caries and periodontal health epidemiology in Europe. *International Dental Journal*, 2001, vol. 51, no. S6, pp. 392–398. https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2001.tb00585.x

3. Denisova Yu. L. Impact complex treatment of patients with periodontal disease, combined with state dentoalveolar deformation on periodontal tissue. *Stomatolog* [Stomatologist], 2012, no. 4, pp. 41–45 (in Russian).

4. Dedova L. N. Systematics of periodontal diseases. *Stomatologicheskii zhurnal* [Stomatological journal], 2002, no. 2, pp. 2–6 (in Russian).

5. Denisova Yu. L. Modern methods of therapeutic and diagnostic measures in patients with periodontal diseases in combination with dentofacial deformities. *Meditsinskii zhurnal* [Medical journal], 2012, no. 3, pp. 49–51 (in Russian).

6. Rubnikovich S. P., Khomich I. S. Bone grafts and substitutes for the elimination of defects and augmentation of the jaw bones in implantology and periodontology. *Stomatolog* [Stomatologist], 2014, no. 1, pp. 77–86 (in Russian).

7. Bottino M. C., Thomas V. Membranes for periodontal regeneration – a materials perspective. *Frontiers of Oral Biology,* 2015, vol. 17, pp. 90–100. https://doi.org/10.1159/000381699

8. Pretzl B., Kim T. S., Holle R., Eickholz P. Long-term results of guided tissue regeneration therapy with nonresorbable and bioabsorbable barriers. IV. A case series of infrabony defects after 10 years. *Journal of Periodontology*, 2008, vol. 79, no. 8, pp. 1491–1499. https://doi.org/10.1902/jop.2008.070571

9. Lemaitre M., Monsarrat P., Blasco-Baque V., Loubières P., Burcelin R., Casteilla L., Planat-Bénard V., Kémoun Ph. Periodontal tissue regeneration using syngeneic adipose-derived stromal cells in a mouse model. *Stem Cells Translational Medicine*, 2017, vol. 6, no. 2, pp. 656–665. https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0028

10. Shin L., Peterson D. A. Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 2013, vol. 2, no. 1, pp. 33–42. https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0041

11. Alekseeva I. S., Volkov A. V., Kulakov A. A., Gol'dshein D. V. Clinical and experimental study on the use of combined cell transplant on the basis of multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue in patients with severe deficiency of jaws bone tissue. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya* [Cellular transplantology and tissue engineering], 2012, vol. 7, no. 1, pp. 97–105 (in Russian).

12. Rubnikovich S. P., Volotovskii I. D., Denisova Yu. L., Andreeva V. A., Panasenkova G. Yu., Kvacheva Z. B. *Cell technology in the treatment of patients with gum recession*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2019. 199 p. (in Russian).

13. Murphy M. B., Moncivais K., Caplan A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental and Molecular Medicine*, 2013, vol. 45, no. 11, pp. 45–54. https://doi.org/10.1038/emm.2013.94

14. Rubnikovich S. P., Volotovskii I. D., Denisova Yu. L., Dedova L. N., Andreeva V. A., Panasenkova G. Yu., Novik T. P. Applicaton of cell biotechnologies in the treatment of gum recession. *Stomatolog* [Stomatologist], 2019, no. 2, pp. 50–55 (in Russian).

15. Perova M. D., Gaivoronskaya T. V., Karpyuk V. B., Tropina A. V. Characteristics of the degree of replacement of different topography periodontal defects after autotransplantation of vascular-stromal cell fraction of lipoaspirate. *Kubanskii nauchnyi meditsinskii vestnik* [Kuban scientific medical bulletin], 2013, no. 6, pp. 142–148 (in Russian).

16. Rubnikovich S. P., Volotovskii I. D., Denisova Yu. L., Andreeva V. A., Panasenkova G. Yu. The rationale for the use of stem cells in the treatment of gum recession. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 4, pp. 476–484 (in Russian).

17. Alyamovskii V. V., Shestakova L. A., Yarygin E. I., Schmidt P. A., Lazarenko L. I. The use of stem cells of the blood of a rat fetus in inflammatory and destructive processes in periodontal tissues. *Institut stomatologii* [Institute of dentistry], 2014, no. 1, pp. 103–105 (in Russian).

18. Rubnikovich S. P., Volotovskii I. D., Denisova Yu. L., Andreeva V. A., Panasenkova G. Yu., Kvacheva Z. B. The use of cell technology in the treatment of patients with gum recession. *Meditsinskii zhurnal* [Medical journal], 2019, no. 2, pp. 101–107 (in Russian).

19. Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Andreeva V. A., Kvacheva Z. B., Panasenkova G. Yu., Khomich I. S. Clinical estimation of the efficacy mesenchymal stem cells and bioplastic material COLLOST for treating gingival recession in the experiment *in vivo*. *Rossiiskaya stomatologiya* [Russian dentistry], 2018, vol. 11, no. 3, pp. 35–44 (in Russian).

20. Sysoeva V. Yu., Ternova Yu. M. Stem cells in dentistry. *Sovremennaya stomatologiya* [Modern dentistry], 2012, no. 2, pp. 28a–30 (in Russian).

21. Rubnikovich S. P., Volotovskii I. D., Denisova Yu. L., Andreeva V. A., Panasenkova G. Yu., Novik T. P. Dental cell biotechnologies in the treatment of periodontal diseases. *Stomatologiya. Estetika. Innovatsii* [Dentistry. Aesthetics. Innovations]. 2019, vol. 3, no. 2, pp. 136–143 (in Russian).

22. Rubnikovich S. P., Sirak S. V., Denisova Yu. L., Andreeva V. A., Kuz'menko E. V., Khomich I. S., Volotovskii I. D. Clinical and roentgenological evaluation of the status of periodontal tissues in laboratory animals in the application of mesenchymal stem cells. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 2, pp. 178–190 (in Russian). https://doi. org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-178-190

23. Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Vladimirskaya T. E., Andreeva V. A., Kvacheva Z. B., Panasenkova G. Yu., Volotovskii I. D. Regenerative cell technology in the treatment of gum recession. *Sovremennye tekhnologii v meditsine* [Modern technologies in medicine], 2018, no. 4, pp. 94–104 (in Russian).

24. Barmasheva A. A., Nikolaenko N. S., Samusenko I. A. A comparative study of the influence of skin fibroblasts and bone marrow stromal cells included in collagen gel on gingiva regeneration. *Parodontologiya* [Periodontology], 2012, vol. 17, no. 4, pp. 20–25 (in Russian).

25. Rubnikovich S. P., Vladimirskaya T. E., Shved I. A., Veyalkina N. N. Method for modeling experimental periodontitis in animals. *Meditsinskii zhurnal* [Medical journal], 2011, no. 1, pp. 97–101 (in Russian).

26. Rubnikovich S. P., Khomich I. S., Denisova Yu. L. Morphological changes in bone tissue around dental implants after low-intensity ultrasound applications. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceeding of the National Academy of Science of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 20–27 (in Russian).

27. Rubnikovich S. P., Maizet A. I., Denisova Yu. L., Bykova N. I., Arutyunov A. V., Kopylova I. A., Avanesyan R. A. The effect of magnetophototherapy on morphological changes of tissues of pathologically changed periodontium. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical news of North Caucasus*, 2017, vol. 12, no. 3, pp. 303–307 (in Russian).

28. Sirak S. V., Rubnikovich S. P., Shchetinin E. V., Perikova M. G., Petrosyan G. G., Bykova N. I., Kobylkina T. L., Didenko M. O. Immunohistochemical evaluation of changes in periodontal tissues in experimental animals with bone skeleton osteoporosis. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical news of North Caucasus*, 2019, vol. 14, no. 4, pp. 681–685 (in Russian).

29. Shchetinin E. V., Sirak S. V., Rubnikovich S. P., Kochkarova Z. M., Andreev A. A., Muratova A. Yu., Perikova M. G., Petrosyan G. G. Morphometric parameters of reparative regeneration of the bone tissue in terms of medicinal phonophoresis with hydrocortisone and hyaluronic acid. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical news of North Caucasus*, 2019, vol. 14, no. 4, pp. 660–663 (in Russian).

30. Garunov M. M., Sevbitov A. V., Dolgalev A. A., Sirak S. V., Solov'eva O. A., Remizova A. A., Dzgoeva M. G., Rubnikovich S. P. Clinical and radiographic assessment of osteointegration of dental implants after remodeling of the perimplant zone. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical news of North Caucasus*, 2019, vol. 14, no. 4, pp. 699–701 (in Russian).

31. Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Fomin N. A. Digital laser speckle technologies in measuring blood flow in biotissues and the stressed-strained state of the maxillodental system. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2017, vol. 90. no. 6, pp. 1513–1523. https://doi.org/10.1007/s10891-017-1713-8

32. Denisova Yu. L., Bazylev N. B., Rubnikovich S. P., Fomin N. A. Laser speckle technology in stomatology. diagnostics of stresses and strains of hard biotissues and orthodontic and orthopedic structures. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2013, vol. 86, no. 4, pp. 940–951. https://doi.org/10.1007/s10891-013-0915-y

33. Bazylev N. B., Rubnikovich S. P. Investigation of the stressed-strained state of cermet dentures using digital laser speckle-photographic analysis. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2009, vol. 82, no. 4, pp. 789–793. https://doi.org/10.1007/s10891-009-0247-0_

34. Fomin N., Fuentes C., Hirano T., Rubnikovich S., Bazylev N., Lavinskaya E. [et al.]. Laser monitor for soft and hard biotissue analysis using dynamic speckle photography. *Journal of Laser Physic*, 2003, vol. 13, no. 5, pp. 786–795.

35. Denisova Yu. L., Vladimirskaya T. E. Experimental substantiation of the use of vacuum laser therapy in the complex treatment of patients with periodontal diseases in combination with dentoalveolar anomalies and deformities. *Voennaya meditsina* [Military medicine], 2013, vol. 26, no. 1, pp. 103–107 (in Russian).

Information about the authors

Sergey P. Rubnikovich – D. Sc. (Med.), Professor, rector of Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rubnikovichs@mail.ru

Sergey V. Sirak – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Stavropol State Medical University (310, Mir Str., 355017, Stavropol, Russian Federation). E-mail: sergejsirak@yandex.ru

Yuliya L. Denisova – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: denisova-yul@mail.ru

Vasilina A. Andreeva – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vasilinastomatolog@tut.by

Elena V. Kuzmenko – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: elena-stom@yandex.ru

Tatiana E. Vladimirskaya – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tan_2304@inbox.ru

Ilya S. Khomich – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ilya.khomich@gmail.com

Igor D. Volotovsky – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volot@biobel.bas-net.by

Информация об авторах

Рубникович Сергей Петрович – д-р мед. наук, профессор, ректор Белорусского государственного медицинского университета (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rubnikovich@mail.ru

Сирак Сергей Владимирович – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом. Ставропольский государственный медицинский университет (ул. Мира, 310, 355017, г. Ставрополь, Российская Федерация). E-mail: sergejsirak@yandex.ru

Денисова Юлия Леонидовна – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: denisova-yul@mail.ru

Андреева Василина Анатольевна – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vasilinastomatolog@tut.by

Кузьменко Елена Викторовна – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: elena-stom@yandex.ru

Владимирская Татьяна Эрнстовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tan_2304@inbox.ru

Хомич Илья Станиславович – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ilya.khomich@gmail.com

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volot@biobel.bas-net.by

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.127-002:616.124.2-008-07-08
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-452-460

Поступила в редакцию 16.09.2020
Received 16.09.2020

Н. П. Митьковская[1], Е. М. Балыш[2], Т. В. Статкевич[2], Н. А. Ладыгина[3], Е. Б. Петрова[2], Н. Б. Конончук[3], Е. М. Керко[3]

[1]Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
[3]Городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Минск, Республика Беларусь

СИСТОЛИЧЕСКАЯ ДИСФУНКЦИЯ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА У ПАЦИЕНТОВ С КЛИНИЧЕСКИ ПОДОЗРЕВАЕМЫМ МИОКАРДИТОМ

Аннотация. Целью исследования было изучить особенности течения клинически подозреваемого миокардита, осложненного развитием систолической дисфункции левого желудочка (ЛЖ). В исследование были включены 93 пациента с клинически подозреваемым миокардитом. Средний возраст составил 36,63 ± 1,15 года. У 43,01 % обследованных заболевание сопровождалось снижением систолической функции ЛЖ. В группе пациентов с систолической дисфункцией ЛЖ в сравнении с лицами с сохранной фракцией выброса ЛЖ был выявлен значимо более низкий удельный вес мужчин (75 % против 81 % соответственно, $\chi^2 = 9{,}3$, $p < 0{,}01$) и более высокий среднегрупповой показатель возраста (40,7 ± 1,87 и 33,6 ± 1,3 года соответственно, $p < 0{,}01$). Течение заболевания при развитии систолической дисфункции ЛЖ характеризовалось более частым развитием нарушений ритма (65 % против 43,3 % соответственно, $\chi^2 = 4{,}3$, $p < 0{,}05$) и более высоким показателем частоты сердечных сокращений при поступлении (94,5 (75–100) и 85 (70–89) ударов в минуту соответственно, $p = 0{,}006$). Структурно-функциональное состояние сердца по данным эхокардиографии у пациентов со сниженной фракцией выброса ЛЖ в сравнении с пациентами с отсутствием ее снижения характеризовалось бóльшими размерами камер сердца, более выраженными нарушениями локальной сократимости миокарда ЛЖ, более частым вовлечением в патологический процесс правого желудочка (56,3 % против 22,2 % соответственно, $\chi^2 = 6{,}4$, $p < 0{,}05$). Выявлена взаимосвязь между фракцией выброса левого желудочка и возрастом пациента ($r = -0{,}36$), частотой сердечных сокращений при поступлении ($r = -0{,}32$), выраженностью сердечной недостаточности при поступлении, степенью нарушения локальной сократимости ЛЖ, снижением функции правого желудочка (TAPSE, $r = 0{,}58$), распространенностью фиброза миокарда по данным кардиоваскулярной магнитно-резонансной томографии ($r = -0{,}32$).

Ключевые слова: клинически подозреваемый миокардит, систолическая дисфункция левого желудочка, эхокардиография, кардиоваскулярная магнитно-резонансная томография

Для цитирования: Систолическая дисфункция левого желудочка у пациентов с клинически подозреваемым миокардитом / Н. П. Митьковская [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 452–460. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-452-460

Natalya P. Mitkovskaya[1], Elena M. Balysh[2], Tatsiana V. Statkevich[2], Nina A. Ladygina[3], Ekaterina B. Petrova[2], Natallia B. Kananchuk[3], Alena M. Kiarko[3]

[1]Republican Scientific and Practical Centre "Cardiology", Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[3]Minsk City Emergency Hospital, Minsk, Republic of Belarus

SYSTOLIC LEFT VENTRICULAR DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH CLINICALLY SUSPECTED MYOCARDITIS

Abstract. The aim of the study was to investigate the features of clinically suspected myocarditis complicated by the left ventricular systolic dysfunction development. 93 patients with clinically suspected myocarditis were examined. The average age was 36.63 ± 1.15 years. In 43.01 % of patients the disease was accompanied by a decrease in left ventricular systolic function. In the group of patients with left ventricular systolic dysfunction in comparison with those with preserved left ventricular ejection fraction, a significantly lower proportion of men (75 % versus 81 %, respectively, $\chi^2 = 9.3$, $p < 0.01$) and a higher average group age (40.7 ± 1.87 versus 33.6 ± 1.3 years, respectively, $p < 0.01$) were revealed. The course of the disease in patients with left ventricular systolic dysfunction was characterized by a more frequent development of rhythm disturbances (65 % versus 43.3 %, respectively, $\chi^2 = 4.3$, $p < 0.05$) and a higher heart rate at admission (94.5 (75–100) and 85 (70–89) beats per minute, respectively, $p = 0.006$). The structural and functional state of the heart according to echocardiography in patients with a reduced left ventricular ejection fraction versus comparison group was characterized by larger heart chambers sizes, more pronounced violations of local left ventricular contractility, more frequent involvement of the right ventricle in the pathological process (56.3 % versus 22.2 %, respectively, $\chi^2 = 6.4$, $p < 0.05$). The relationships between the left ventricular ejection fraction

and the patient's age (r = –0.36), the value of the heart rate at admission (r = –0.32), the severity of heart failure at admission, the degree of impaired local contractility of the left ventricle, the degree of right ventricular function (TAPSE, r = 0.58), the severity of myocardial fibrosis according to cardiovascular magnetic resonance imaging (r = –0.32) were revealed.

Keywords: clinically suspected myocarditis, left ventricular systolic dysfunction, echocardiography, cardiovascular magnetic resonance imaging

For citation: Mitkovskaya N. P., Balysh E. M., Statkevich T. V., Ladygina N. A., Petrova E. B., Kananchuk N. B., Kiarko A. M. Systolic left ventricular dysfunction in patients with clinically suspected myocarditis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 452–460 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-452-460

Введение. Статистика по уровню заболеваемости миокардитами весьма условна, так как часть случаев не учитывается в связи с отсутствием обращения за медицинской помощью при бессимптомном или малосимптомном течении заболевания. С другой стороны, в ряде случаев заболевание манифестирует в виде внезапной сердечной смерти. В структуре причин внезапной сердечной смерти по данным аутопсии миокардит выявлялся в диапазоне от 2 до 42 % случаев [1]. Так, по результатам изучения данных патологоанатомического исследования 453 случаев внезапной сердечной смерти (278 мужчин (61,4 %) и 175 женщин (38,6 %) в возрасте 15–81 год) в период с 1994 по 2003 г. установлено, что в 8,6 % случаев причиной смерти стало воспалительное поражение миокарда [2].

Патогенез миокардита до конца неясен, однако согласно данным, полученным в экспериментальных моделях вирусного миокардита, в течении болезни можно выделить три фазы: острую, подострую и хроническую. Острая фаза связана с инвазией вируса в клетки миокарда, его репликацией, разрушением кардиомиоцитов и длится 1–3 дня. В результате некроза кардиомиоцитов обнажаются внутриклеточные белки, которые вызывают активацию иммунной системы макроорганизма, привлекая клетки – натуральные киллеры и макрофаги в очаг повреждения. Подострая фаза миокардита, которая может продолжаться от нескольких недель до нескольких месяцев, характеризуется развитием аутоиммунных реакций и заключается в активации вирусспецифичных Т-лимфоцитов. Выработка цитокинов (интерлейкинов 1 и 6, фактора некроза опухолей α и др.) и противовирусных и антимиокардиальных антител увеличивает повреждение миокарда, что может приводить к нарушению его контрактильной функции. В большинстве случаев элиминация вируса сопровождается стиханием иммунного ответа и функция миокарда постепенно восстанавливается. Однако в ряде случаев аутоиммунное воспаление миокарда персистирует вне зависимости от наличия вирусного генома в кардиомиоцитах, в результате чего процесс переходит в хроническую фазу, которая характеризуется ремоделированием сердца и развитием дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) [3].

Прогноз при миокардите зависит от этиологии, клинических проявлений в дебюте и варианта течения заболевания. У 50 % пациентов миокардит разрешается в течение 2–4 недель, у 25 % – сопровождается развитием персистирующей миокардиальной дисфункции, а у 12–25 % – резким ухудшением состояния вплоть до летального исхода или прогрессированием до тяжелой ДКМП, требующей трансплантации сердца [1]. В одноцентровый регистр (Charité, Department of Cardiology, Berlin, Germany, 2015–2018) было включено 210 пациентов с гистологически верифицированным миокардитом, которым по показаниям была назначена терапия хронической сердечной недостаточности (ХСН). Период наблюдения составил 2 года. При оценке фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) после истечения периода наблюдения получены данные, что в 47 % случаев ФВ ЛЖ не восстановилась, причем у 13 % этот показатель не изменился, а у 34 % улучшился, но не достиг нормальных значений. У 53 % пациентов была зарегистрирована сохранная систолическая функция ЛЖ, у 26 % из них ФВ ЛЖ восстановилась.

По данным McCarthy с соавт. [4], среди 147 пациентов с гистологически верифицированным миокардитом (фульминантным и острым) уровень выживаемости без трансплантации сердца после 5,6 года наблюдения составил 79 %.

Диагностика миокардита может быть затруднена из-за многообразия и неспецифичности клинических проявлений. Заболевание может манифестировать с развития нарушений ритма и проводимости, симптомов сердечной недостаточности, стенокардиальных жалоб или протекать бес-

симптомно [1, 3, 5]. В связи с этим в неинвазивной диагностике миокардита необходимо использовать комплекс клинических и лабораторно-инструментальных признаков.

Рабочей группой по болезням перикарда и миокарда Европейского общества кардиологов в 2013 г. были предложены критерии клинически подозреваемого миокардита, которые позволяют предположить диагноз при изучении клинической картины, анамнеза заболевания, данных инструментального и лабораторного обследования (табл. 1) [1].

Таблица 1. **Критерии клинически подозреваемого миокардита**

Table 1. **Criteria for clinically suspected myocarditis**

Критерии	Описание критериев
Клинические[*]	Острая боль в груди, проявления перикардита или псевдоишемическая боль
	Появление (от нескольких дней до 3 мес.) или прогрессирование одышки в покое или при физической нагрузке и/или утомляемости, с или без признаков лево- и/или правожелудочковой сердечной недостаточности
	Подострое/хроническое начало (>3 мес.) или прогрессирование одышки в покое или при физической нагрузке и/или утомляемости, с или без признаков лево- и/или правожелудочковой сердечной недостаточности
	Сердцебиение и/или другие необъяснимые симптомы аритмий, обмороки, внезапная смерть
	Необъяснимый кардиогенный шок
Диагностические:	
I. Особенности электрокардиограммы/ холтеровского мониторирования/ стресс-тестов	Недавние изменения по данным 12-канальной электрокардиографии, холтеровского мониторирования и/или стресс-тестов: атриовентрикулярные блокады (АВ-блокады) любой степени, блокада любой из ножек пучка Гиса, изменения сегмента ST или зубца Т, синус-арест, желудочковая тахикардия или фибрилляция желудочков, асистолия, фибрилляция предсердий, уменьшение амплитуды зубца R, нарушения внутрижелудочковой проводимости, патологический зубец Q, низкий вольтаж эхокардиографии, частая экстрасистолия, наджелудочковая тахикардия
II. Маркеры повреждения миокарда	Повышение уровня тропонина Т/I
III. Функциональные и структурные аномалии при визуализации сердца (эхокардиография/ангиография/ магнитно-резонансная томография)	Новые, необъяснимые известными причинами лево- и/или правожелудочковые структурные и функциональные отклонения (в том числе случайные находки у бессимптомных пациентов): локальное нарушение сократимости миокарда, изменение глобальной систолической и/или диастолической функции, с или без дилатации желудочков, с или без утолщения стенок, с или без признаков перикардита, с или без внутриполостных тромбов
IV. Изменения по данным кардиоваскулярной магнитно-резонансной томографии	Отек и/или классический паттерн (набор критериев) миокардита

Примечание. Подозрение на миокардит возникает в случае, если у пациента наблюдается ≥1 клиническое проявление и ≥1 диагностический критерий из разных категорий при отсутствии: 1) ангиографических признаков поражения коронарных артерий (стеноз коронарных артерий ≥50 %); 2) ранее выявленных сердечно-сосудистых заболеваний или экстракардиальной патологии, которые могли бы объяснить существующую симптоматику (например, гипертироз, пороки сердца и др.). Вероятность тем выше, чем больше критериев выявлено у пациента. [*] – при отсутствии клинических симптомов у пациента для постановки диагноза необходимо наличие не менее двух диагностических критериев.

Ультразвуковое исследование сердца является доступным методом оценки состояния функции миокарда, глобальной и локальной сократимости, размеров камер сердца, толщины миокарда. Раннее выполнение исследования у пациентов с подозрением на миокардит позволяет исключить другую кардиальную патологию, которая может обусловливать клиническую симптоматику, а также дает возможность оценить структурно-функциональное состояние миокарда, что определяет дальнейшую лечебно-диагностическую тактику [1, 3]. В дополнение к вышеизложен-

ному эхокардиография позволяет оценить наличие перикардиального выпота и внутриполостного тромбоза.

Кардиоваскулярная магнитно-резонансная томография (КМРТ) в настоящее время является наиболее информативным методом неинвазивной диагностики миокардита [1, 3]. Кроме оценки структурно-функциональных показателей состояния миокарда по результатам КМРТ возможна также оценка тканевых характеристик миокарда, таких как отек, гиперемия и фиброз. Для выявления указанных изменений рекомендовано проведение оценки Т2- и Т1-взвешенных изображений в раннюю и позднюю фазы контрастирования препаратами гадолиния (критерии Lake-Louise) [1]:

1) локальный или диффузный отек миокарда на Т2-взвешенных изображениях;

2) раннее контрастирование, визуализируемое на Т1-взвешенных изображениях через 1 мин после внутривенного введения контрастного препарата (гадолиний);

3) отсроченное контрастирование, визуализируемое на Т1-взвешенных изображениях через 10–20 мин после введения контрастного препарата (гадолиний).

В случае выполнения КМРТ в трех рекомендуемых последовательностях при выявлении двух и более из трех тканевых критериев чувствительность метода составляет около 78 %, в случае выявления изменений только в фазу отсроченного контрастирования – 68 % [6].

При интерпретации результатов МРТ сердца возможно дифференцировать ишемическую и неишемическую природу кардиомиопатии у пациентов с увеличением размеров и диффузным гипокинезом ЛЖ, предположить специфическую этиологию поражения миокарда, а также оценить прогноз, исходя из объема необратимо поврежденного миокарда [7].

Золотым стандартом диагностики миокардита является эндомиокардиальная биопсия (ЭМБ) с проведением гистологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований биоптата с целью оценки наличия воспалительной инфильтрации миокарда, очагов некроза и фиброза, а также наличия вирусных нуклеиновых кислот в кардиомиоцитах [1, 3, 5]. Однако проведение ЭМБ сопряжено с невысокой доступностью данного метода исследования и наличием риска осложнений. В связи с вышеизложенным использование этого метода диагностики в настоящее время показано в первую очередь при гемодинамической нестабильности вследствие выраженной систолической дисфункции миокарда или жизнеугрожающих аритмий, а также при отсутствии положительной динамики на фоне назначения терапии ХСН и подозрении на инфильтративное поражение миокарда [1].

Прогноз и риск неблагоприятных исходов у пациентов с миокардитом изучались в ряде исследований. Согласно данным J. W. Lee с соавт. [8], основанным на анализе 37 случаев острого миокардита, выявление изменений в фазе позднего контрастирования по данным КМРТ (признаки фиброза миокарда) было ассоциировано с более высоким уровнем неблагоприятных событий и ухудшением прогноза в отношении восстановления функции ЛЖ в период до 41 мес. Аналогичные данные были получены в исследовании, включавшем 222 пациента с гистологически верифицированным вирусным миокардитом. Наличие очагов накопления в фазе отсроченного контрастирования по данным КМРТ было наиболее сильным предиктором смерти у этой категории пациентов [9].

Цель исследования – изучить особенности течения клинически подозреваемого миокардита, осложненного развитием систолической дисфункции левого желудочка.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 93 пациента с клинически подозреваемым миокардитом. Средний возраст составил 36,63 ± 1,15 года. Диагноз клинически подозреваемого миокардита устанавливали на основании критериев, предложенных экспертами Рабочей группы по болезням перикарда и миокарда Европейского общества кардиологов в 2013 г. (табл. 1) [1].

Дополнительным симптомом, поддерживающим клиническое подозрение миокардита, считали наличие лихорадки ($T > 38$ °C) в период клинических проявлений либо менее чем за 30 дней до них при наличии или отсутствии симптомов острой респираторной вирусной инфекции (озноб, боль в голове или мышцах, общее недомогание) или кишечной инфекции (снижение аппетита, тошнота, рвота, диарея).

В исследовании использовали клинические, лабораторные, инструментальные и статистические методы. Проводили изучение анамнеза заболевания, клинических проявлений в дебюте, показателей гемодинамики (систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД), частота сердечных сокращений (ЧСС) при поступлении). Лабораторные методы включали исследование общего анализа крови, уровня С-реактивного белка, тропонина, мозгового натриуретического пептида (МНУП), показателей функции почек, печени. Инструментальные методы включали выполнение ЭКГ, ультразвукового исследования сердца в максимально ранние сроки, МРТ сердца, коронароангиографии (КАГ) при необходимости исключения коронарного атеросклероза.

Для оценки локальной сократимости миокарда согласно рекомендациям Американского общества кардиологов использовали условную 16-сегментную модель. Сократимость каждого сегмента определяли баллах: 1 – сократительная способность сохранена, 2 – гипокинез, 3 – акинез, 4 – дискинез. Вычисляли индекс локальной сократимости (ИЛС), представляющий собой отношение общего числа баллов к количеству визуализированных сегментов, и суммарную сократимость пораженных сегментов (ССПС), представляющую собой сумму баллов сегментов с нарушенной сократимостью.

Обработку полученных результатов проводили с использованием статистических пакетов Excel, Statistica (версия 10.0, StatSoft, Inc., США). Для описания количественных признаков были проанализированы параметры распределения (соответствие вида распределения значений изучаемого признака закону нормального распределения) с использованием критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения признака данные представляли в виде среднего значения признака (M) и значения стандартной ошибки среднего значения (m). В случае распределения признака, отличного от нормального, данные представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала между 25-м и 75-м процентилями. Сравнение двух независимых групп по количественному признаку в случае распределения значений изучаемого признака по закону нормального распределения осуществляли при помощи *t*-критерия Стьюдента. Для сравнения двух независимых групп, не соответствующих закону нормального распределения, использовали критерий Манна–Уитни. Для сравнения групп по качественным признакам проводили анализ частоты встречаемости признака. Различия между независимыми выборками оценивали по частоте исследуемого признака на основе точного критерия Фишера, теста χ^2. Различия в группах считали значимыми при вероятности безошибочного прогноза 95,5 % ($p < 0,05$) [10].

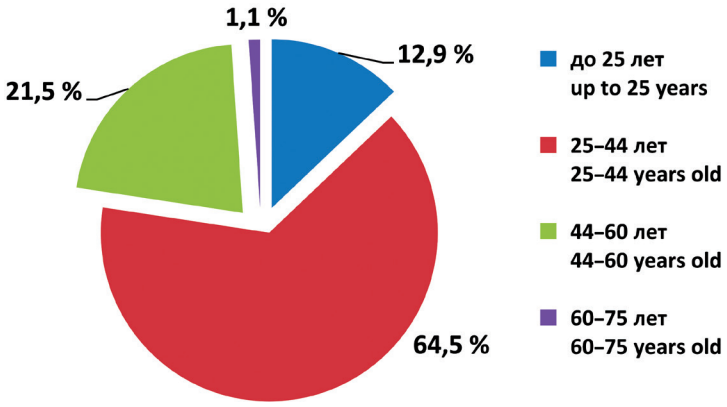
Для выявления взаимосвязи между двумя признаками выполняли корреляционный анализ. Взаимосвязь между нормально распределенными количественными признаками оценивали с помощью параметрического корреляционного анализа Пирсона, взаимосвязь между количественными признаками независимо от вида их распределения, а также между количественными и качественными порядковыми признаками – с помощью непараметрического метода корреляционного анализа Спирмена. В зависимости от значения коэффициента корреляции (r) определяли силу корреляции: $|r| \leq 0,25$ – слабая; $0,25 < |r| < 0,75$ – умеренная; $|r| = >0,75$ – сильная [10].

Результаты и их обсуждение. В возрастной структуре пациентов, включенных в исследование, преобладали лица молодого возраста (64,5 %). Структура пациентов в зависимости от возраста представлена на рисунке.

Среди обследованных лиц 74 (79,6 %) – мужчины. Курил 21 (22,6 %) пациент, у 39 (41,9 %) выявлено увеличение индекса массы тела более 25 кг/м^2, 30 (32,3 %) имели установленный диагноз артериальной гипертензии, у 4 пациентов зарегистрированы нарушения углеводного обмена.

В исследуемой когорте пациентов изменения конечной части желудочкового комплекса были представлены элевацией сегмента ST (у 33 (35,5 %) человек), депрессией сегмента ST (у 12 (12,9 %)), инверсией зубца Т (у 35 (37,6 %)).

У 50 (53,8 %) пациентов, включенных в исследование, заболевание сопровождалось развитием таких нарушений ритма, как наджелудочковая ($n = 29$) и желудочковая ($n = 26$) экстрасистолия, синусовая брадикардия ($n = 9$), пароксизмальная наджелудочковая тахикардия ($n = 11$), пароксизмы фибрилляции/трепетания предсердий ($n = 11$), пароксизмальная желудочковая тахикардия ($n = 7$), фибрилляция желудочков ($n = 4$).



Возрастная структура пациентов, включенных в исследование

Age structure of the patients included in the study

При оценке структурно-функционального состояния сердца методом эхокардиографии (Эхо-КГ) выявлено, что у 40 (43,01 %) пациентов заболевание сопровождалось снижением систолической функции ЛЖ (ФВ ЛЖ < 55 %), а у 47 (50,5 %) – нарушением локальной сократительной способности миокарда.

Согласно данным Эхо-КГ, вовлечение правого желудочка в патологический процесс выявлялось в 22,2 % случаев, что сопровождалось снижением показателя систолической экскурсии плоскости трикуспидального кольца (TAPSE) – менее 17 мм. Вовлечение в патологический процесс перикарда выявлялось у 18 (19,4 %) пациентов. Формирование тромбов в полости ЛЖ на фоне миокардита регистрировалось у 5 (5,4 %) пациентов.

МРТ сердца было выполнено 65 пациентам. Достаточный набор МРТ-критериев для диагностики миокардита (наличие двух и более диагностических МРТ-критериев миокардита Lake-Louise) получен у 46 (70,8 %) пациентов. Более высокую информативность МРТ-исследования в сравнении с другими неинвазивными методиками подтверждает тот факт, что у 28 пациентов с достаточным набором МРТ-критериев миокардита (двух и более) по данным ультразвукового исследования сердца изменений не выявлено.

В рамках дифференциальной диагностики ишемического и воспалительного поражения миокарда 62 пациентам выполнена КАГ. По результатам проведенного исследования у 43 пациентов не выявлено поражения коронарных артерий, у 13 – зарегистрированы гемодинамически незначимые атеросклеротические изменения (стеноз менее 50 %), у 5 – миокардиальные мостики, у 1 – признаки дилатации коронарных артерий, у 1 – коронарный ангиоспазм в отсутствие атеросклеротического поражения коронарного русла.

С целью выявления особенностей течения заболевания при развитии систолической дисфункции ЛЖ пациенты были разделены на две группы: с развитием систолической дисфункции ЛЖ (ФВ ЛЖ < 55 %, $n = 40$) и с сохранной ФВ ЛЖ ($n = 53$).

Выявлено, что в группе пациентов с систолической дисфункцией ЛЖ удельный вес мужчин был значимо ниже, чем в группе сравнения (75 % против 81 % соответственно, $\chi^2 = 9,3$, $p < 0,01$), а среднегрупповой показатель возраста был выше и составил 40,7 ± 1,87 и 33,6 ± 1,3 года соответственно ($p < 0,01$). У пациентов с признаками воспалительной кардиомиопатии (КМП) значимо чаще развивались нарушения ритма, чем в группе сравнения (65 % против 43,3 % соответственно, $\chi^2 = 4,3$, $p < 0,05$), причем такое жизнеугрожающее нарушение ритма, как фибрилляция желудочков, регистрировалось только в группе пациентов со сниженной ФВ ЛЖ.

При оценке показателей гемодинамического статуса при поступлении получены данные, что для пациентов со сниженной систолической функцией ЛЖ были характерны более высокие значения ЧСС, чем для группы сравнения (94,5 (75–100) и 85 (70–89) ударов в минуту соответственно, $p = 0,006$) (табл. 2).

При анализе результатов лабораторного исследования в основной группе в сравнении с группой пациентов с сохранной ФВ ЛЖ выявлены значимо более высокие среднегрупповые значения

Таблица 2. **Среднегрупповые показатели САД, ДАД и ЧСС при поступлении у пациентов со сниженной и сохранной фракцией выброса левого желудочка**

Table 2. **Average group parameters of SBP, DBP and a heart rate at admission in patients with reduced and intact left ventricular ejection fraction**

Показатель	Группа пациентов с систолической дисфункцией ЛЖ (ФВ ЛЖ < 55 %) (n = 40)	Группа сравнения (ФВ ЛЖ ≥ 55 %) (n = 53)
САД, мм рт. ст. (M ± m)	123,3 ± 3,15	121,4 ± 1,96
ДАД, мм рт. ст. (Me (25 %–75 %))	80 (70–85)	80 (70–80)
ЧСС, уд/мин (Me (25 %–75 %))	94,5 (75–100)*	85 (70–89)

Примечание. * – достоверность различия показателей при $p < 0,05$. ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений.

количества лейкоцитов в периферической крови (11,5 (8,2–13,9) и 9,1 (6,9–11,3)·10^9/л соответственно, $p < 0,05$), концентрации Д-димеров (604 (179–1640) и 186,5 (102–522) нг/мл соответственно, $p < 0,05$), МНУП (558,5 (91,9–1090) и 36,9 (12,5–103,5) пг/мл соответственно, $p < 0,001$), креатинина в сыворотке крови (111,6 (88,4–141) и 86,5 (80,4–103,5) мкмоль/л соответственно, $p < 0,001$), значения скорости клубочковой фильтрации (СКФ – 68,9 ± 4,7 и 92,02 ± 2,58 мл/мин/1,73 м^2 соответственно, $p < 0,001$).

Структурно-функциональное состояние сердца по данным Эхо-КГ у пациентов со сниженной систолической функцией ЛЖ в сравнении с лицами с нормальной ФВ ЛЖ характеризовалось большими размерами камер сердца, более выраженными нарушениями локальной сократимости ЛЖ (табл. 3), более частым вовлечением в патологический процесс правого желудочка (56,3 % против 22,2 % соответственно, $\chi^2 = 6,4$, $p < 0,05$).

Таблица 3. **Результаты ультразвукового исследования сердца у пациентов исследуемых групп**

Table 3. **Echocardiography results in patients of the study groups**

Показатель	Группа пациентов с систолической дисфункцией левого желудочка (ФВ ЛЖ < 55 %) (n = 40)	Группа сравнения (ФВ ЛЖ ≥ 55 %) (n = 53)
ЛП, см (M ± m)	3,95 ± 0,11*	3,52 ± 0,05
КДД ЛЖ, см (M ± m)	5,79 ± 0,15*	4,98 ± 0,08
КСД ЛЖ, см (M ± m)	4,53 ± 0,19*	3,15 ± 0,07
КДО ЛЖ, мл (M ± m)	145,11 ± 9,69*	100,2 ± 3,6
КСО ЛЖ, мл (Me (25 %–75 %))	72 (51–110)*	36 (32–44)
УО ЛЖ, мл (Me (25 %–75 %))	53 (44–74)	63 (51–72)
ИЛС (Me (25 %–75 %))	2 (1,44–2,28)*	1,06 (1–1,18)
ССПС (Me (25 %–75 %))	32 (16–35)*	6 (4–8)
ПП, см (M ± m)	4 ± 0,14*	3,58 ± 0,05
ПЗРПЖ, см (M ± m)	3,12 ± 0,13*	2,68 ± 0,08
TAPSE, мм (M ± m)	15,87 ± 1,01*	23,3 ± 0,68

Примечание. * – достоверность различия показателей при $p < 0,05$. ЛП – левое предсердие, КДД ЛЖ – конечный диастолический диаметр левого желудочка, КСД ЛЖ – конечный систолический диаметр левого желудочка, КДО ЛЖ – конечный диастолический объем левого желудочка, КСО ЛЖ – конечный систолический объем левого желудочка, УО ЛЖ – ударный объем левого желудочка, ИЛС – индекс локальной сократимости левого желудочка, ССПС – суммарная сократимость пораженных сегментов, ПП – правое предсердие, ПЗРПЖ – передне-задний размер правого желудочка, TAPSE – систолическая экскурсия плоскости трикуспидального кольца.

При проведении корреляционного анализа получены данные о наличии обратной умеренной силы связи между показателем ФВ ЛЖ и возрастом пациента (r = –0,36), значением ЧСС при поступлении (r = –0,32), выраженностью сердечной недостаточности при поступлении (по классификации Стражеско–Василенко – r = –0,65; по классификации NYHA – r = –0,58). Выраженность систолической дисфункции ЛЖ коррелировала со степенью нарушения локальной сократимости ЛЖ (ИЛС – r = –0,87; ССПС – r = –0,87), снижением функции правого желудочка (TAPSE –

r = 0,58), размерами правых отделов сердца (ПП – r = –0,41; ПЗРПЖ – r = –0,41), систолическим давлением в легочной артерии по данным Эхо-КГ (r = –0,54), количеством сегментов с признаками фиброза миокарда по данным КМРТ (r = –0,32).

Заключение. У 43,01 % пациентов с клинически подозреваемым миокардитом заболевание сопровождалось снижением систолической функции ЛЖ. У этой категории пациентов в сравнении с лицами с сохранной ФВ ЛЖ был значимо ниже удельный вес мужчин (75 % против 81 % соответственно, $\chi^2 = 9{,}3$, $p < 0{,}01$) и выше среднегрупповой показатель возраста (40,7 ± 1,87 и 33,6 ± 1,3 года соответственно, $p < 0{,}01$). Течение заболевания при развитии систолической дисфункции ЛЖ характеризовалось более частым развитием нарушений ритма (65 % против 43,3 % соответственно, $\chi^2 = 4{,}3$, $p < 0{,}05$) и более высоким показателем ЧСС при поступлении (94,5 (75–100) и 85 (70–89) ударов в минуту соответственно, $p = 0{,}006$). Структурно-функциональное состояние сердца по данным Эхо-КГ у пациентов со сниженной ФВ ЛЖ в сравнении с лицами с сохранной ФВ ЛЖ характеризовалось бóльшими размерами камер сердца, более выраженными нарушениями локальной сократимости миокарда ЛЖ, более частым вовлечением в патологический процесс правого желудочка (56,3 % против 22,2 % соответственно, $\chi^2 = 6{,}4$, $p < 0{,}05$).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases / A. L. Caforio [et al.] // Eur. Heart J. – 2013. – Vol. 34, N 33. – P. 2636–2648. https://doi.org/10.1093/eurheartj/eht210

2. Fabre, A. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death / A. Fabre, M. N. Sheppard // Heart. – 2005. – Vol. 92, N 3. – P. 316–320. https://doi.org/10.1136/hrt.2004.045518

3. Update on myocarditis / I. Kindermann [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2012. – Vol. 59, N 9. – P. 779–792. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.09.074

4. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis / R. E. McCarthy [et al.] // N. Eng. J. Med. – 2000. – Vol. 342, N 10. – P. 690–695. https://doi.org/10.1056/nejm200003093421003

5. Cardiomyopathies – The special entity of myocarditis and inflamatory cardiomyopathy / F. Escher [et al.] // J. Cardiol. Cardiovasc. Med. – 2019. – Vol. 4, N 2. – P. 53–70. https://doi.org/10.29328/journal.jccm.1001041

6. Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: a JACC white paper / M. G. Friedrich [et al.] // JACC. – 2009. – Vol. 53, N 17. – P. 1475–1487. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.02.007

7. Delayed enhancement cardiovascular magnetic resonance assessment of non-ischaemic cardiomyopathies / H. Mahrholdt [et al.] // Eur. Heart J. – 2005. – Vol. 26, N 15. – P. 1461–1474. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi258

8. Predictive value of cardiac magnetic resonance imaging-derived myocardial strain for poor outcomes in patients with acute myocarditis / J. W. Lee [et al.] // Korean J. Radiol. – 2017. – Vol. 18, N 4. – P. 643–654. https://doi.org/10.3348/kjr.2017.18.4.643

9. Long-term follow-up of biopsy-proven viral myocarditis: predictors of mortality and incomplete recovery / S. Grün [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2012. – Vol. 59, N 18. – P. 1604–1615. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.01.007

10. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : Медиа Сфера, 2002. – 305 с.

References

1. Caforio A. L., Pankuweit S., Arbustini E., Basso C., Gimeno-Blanes J., Felix S. B. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*, 2013, vol. 34, no. 33, pp. 2636–2648. https://doi.org/10.1093/eurheartj/eht210

2. Fabre A., Sheppard M. N. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart*, 2005, vol. 92, no. 3, pp. 316–320. https://doi.org/10.1136/hrt.2004.045518

3. Kindermann I., Barth C., Mahfoud F., Ukena C., Lenski M., Yilmaz A., Klingel K., Kandolf R., Sechtem U., Cooper L. T., Böhm M. Update on Myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*, 2012, vol. 59, no. 9, pp. 779–792. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.09.074

4. McCarthy R. E., Boehmer J. P., Hruban R. H., Hutchins G. M., Kasper E. K., Hare J. M., Baughman K. L. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *New England Journal of Medicine*, 2000, vol. 342, no. 10, pp. 690–695. https://doi.org/10.1056/nejm200003093421003

5. Escher F., Kühl U., Lassner D., Schultheiss H.-P. Cardiomyopathies – The special entity of myocarditis and inflamatory cardiomyopathy. *Journal of Cardiology and Cardiovascular Medicine*, 2019, vol. 4, no. 2, pp. 53–70. https://doi.org/10.29328/journal.jccm.1001041

6. Friedrich M. G., Sechtem U., Schulz-Menger J., Holmvang G., Alakija P., Cooper L. T. [et al.]. Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: a JACC white paper. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009, vol. 53, no. 17, pp. 1475–1487. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.02.007

7. Mahrholdt H., Wagner A., Judd R. M., Sechtem U., Kim R. J. Delayed enhancement cardiovascular magnetic resonance assessment of non-ischaemic cardiomyopathies. *European Heart Journal*, 2005, vol. 26, no. 15, pp. 1461–1474. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi258

8. Lee J. W., Jeong Y. J., Lee G., Lee N. K., Lee H. W., Kim J. Y., Choi B. S., Choo K. S. Predictive value of cardiac magnetic resonance imaging-derived myocardial strain for poor outcomes in patients with acute myocarditis. *Korean Journal of Radiology*, 2017, vol. 18, no. 4, pp. 643–654. https://doi.org/10.3348/kjr.2017.18.4.643

9. Grün S., Schumm J., Greulich S., Wagner A., Schneider S., Bruder O. [et al.]. Long-term follow-up of biopsy-proven viral myocarditis: predictors of mortality and incomplete recovery. *Journal of the American College of Cardiology*, 2012, vol. 59, no. 18, pp. 1604–1615. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.01.007

10. Rebrova O. Yu. *Statistical analysis of medical data. Using the STATISTICA Application Package*. Moscow, Media Sfera Publ., 2002. 305 p. (in Russian).

Информация об авторах

Митьковская Наталья Павловна – д-р мед. наук, профессор, директор. Республиканский научно-практический центр «Кардиология» (ул. Р. Люксембург, 110В, 220036, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mitkovskaya1@mail.ru

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

Статкевич Татьяна Васильевна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: forget-me@tut.by

Ладыгина Нина Аркадьевна – заведующий отделением. Городская клиническая больница скорой медицинской помощи (ул. Лейтенанта Кижеватова, 58, 220024, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: solnin29@gmail.com

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

Конончук Наталья Борисовна – заведующий отделением. Городская клиническая больница скорой медицинской помощи (ул. Лейтенанта Кижеватова, 58, 220024, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nataly.kon0303@yandex.ru

Керко Елена Михайловна – заведующий отделением. Городская клиническая больница скорой медицинской помощи (ул. Лейтенанта Кижеватова, 58, 220024, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Natalya P. Mitkovskaya – D. Sc. (Med.), Professor, Director. Republican Scientific and Practical Center “Cardiology” (110B, R. Luxemburg Str., 220036, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mitkovskaya1@mail.ru

Elena M. Balysh – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: elenashut@tut.by

Tatsiana V. Statkevich – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: forget-me@tut.by

Nina A. Ladygina – Head of the Department. Minsk City Emergency Hospital (58, Lieutenant Kizhevatov Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: solnin29@gmail.com

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

Natallia B. Kananchuk – Head of the Department. Minsk City Emergency Hospital (58, Lieutenant Kizhevatov Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nataly.kon0303@yandex.ru

Alena M. Kiarko – Head of the Department. Minsk City Emergency Hospital (58, Lieutenant Kizhevatov Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus).

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 577.11:612.015.3:612.82]-092.9
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-461-469

Поступила в редакцию 07.02.2020
Received 07.02.2020

Я. И. Новогродская, Е. М. Дорошенко, М. Н. Курбат

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПОСЛЕ МЕТИОНИНОВОЙ НАГРУЗКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Аннотация. Изучено влияние метиониновой нагрузки на состояние пула серосодержащих аминокислот и некоторых метаболически родственных им соединений в различных структурах головного мозга крыс. Данные соединения определяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Во всех исследованных регионах мозга нагрузка метионином в суточной дозе 3 г/кг приводила к однонаправленному дисбалансу серосодержащих соединений – повышению концентраций метионина и гипотаурина (наиболее выраженное в стриатуме), цистатионина (наиболее выраженное в больших полушариях). Значимое повышение концентрации таурина наблюдалось лишь в гипоталамусе и стриатуме. Во всех отделах мозга, кроме стриатума, отмечалось снижение уровня серина – предшественника транссульфурирования. В мозжечке, по сравнению с другими регионами мозга, наблюдалось повышение содержания цистеиновой кислоты и снижение уровня цистенсульфиновой, что указывает на то, что синтез таурина осуществляется преимущественно по пути окисления последней.

Ключевые слова: метиониновая нагрузка, мозг, серосодержащие аминокислоты

Для цитирования: Новогродская, Я. И. Изменение концентраций серосодержащих аминокислот в головном мозге после метиониновой нагрузки в эксперименте / Я. И. Новогродская, Е. М. Дорошенко, М. Н. Курбат // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 461–469. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-461-469

Yana I. Novogrodskaya, Yevgeny M. Doroshenko, Mikhail N. Kurbat

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

CHANGES IN THE CONCENTRATION OF SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS IN THE BRAIN AFTER METHIONINE LOAD IN THE EXPERIMENT

Abstract. The effect of methionine overload on the state of the pool of sulfur-containing amino acids and their metabolites was studied in the various brain structures determined by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). In all regions of the brain studied, methionine led to a unidirectional imbalance of sulfur-containing compounds: there was an increase in the concentrations of methionine, cystathionine and hypotaurine. The most pronounced increase in methionine and hypotaurine levels was observed in the striatum, cystathionine in the hemispheres. A significant increase in taurine concentration was observed only in the hypothalamus and striatum. In other parts of the brain a tendency to increase its level was shown. In all brain regions studied except the striatum, serine levels were decreased. In the cerebellum, in comparison with other regions, an increase in the level of cysteic acid and a decrease in the level of cysteinesulfinic acid were observed, which indicates that taurine synthesis is occurred mainly through the cysteine sulfinate oxidation.

Keywords: methionine load, brain, sulfur-containing amino acids

For citation: Novogrodskaya Ya. I., Doroshenko Ye. M., Kurbat M. N. Changes in the concentration of sulfur-containing amino acids in the brain after methionine load in the experiment. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 461–469 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-461-469

Введение. Гипергомоцистеинемия, являющаяся фактором риска неврологических и психических расстройств, может быть обусловлена дефицитом фолатов, цистатионин-β-синтазы, витаминов B_{12}, B_6, B_2 или заменой нуклеотидов в генах N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолатредуктазы (T428C, G458T, C459T, C677T, A1298C) [1, 2], редуктазы метионинсинтазы (A66G) [3], метионинсинтазы (A2756G) [4]. Продукт трансметилирования многочисленных субстратов – гомоцистеин (Hcy), а в большей степени продукт его окисления – гомоцистеиновая кислота (HCA) обладают нейротоксическим действием и частично обусловливают развитие когнитивных нарушений в результате развития окислительного стресса [5, 6].

© Новогродская Я. И., Дорошенко Е. М., Курбат М. Н., 2020

Эксперименты *in vitro* показали, что цитотоксический эффект Нсу проявляется только в концентрациях свыше 1 ммоль/л. Исходя из этого, авторы считают, что Нсу является слабым нейротоксином [7]. А. А. Болдырев [8] в своих исследованиях также отмечал токсическое влияние Нсу на культуру нервных клеток. НСА локализуется в глиальных клетках префронтальной коры, гипоталамуса, а ее выход из астроцитов имеет место при стимулировании как ионотропных, так и метаботропных глутаматных рецепторов [9]. Многие исследователи отмечают, что токсическое действие Нсу и НСА направлено на глутаматные рецепторы NMDA-типа на нейронах, что приводит к проникновению в нейроны Ca^{2+}, вызывая накопление свободных радикалов [8, 10–12]. Активные формы кислорода реагируют с ненасыщенными жирными кислотами мембранных липидов и запускают реакции перекисного окисления. Вследствие увеличения проницаемости мембран для ионов водорода и кальция, разобщения процессов фосфорилирования и окисления в митохондриях клетка оказывается в условиях недостатка АТФ [13]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что высокий уровень Нсу в крови связан с нарушениями пространственной ориентации, кратковременной и долговременной памяти у животных [14], обусловленными развитием окислительного стресса в мозге [15, 16]. Другие же авторы полагают, что Нсу может оказывать нейротоксическое действие, сходное с ксенобиотиками, такими как толуол и 1,2-диметилгидразин [17].

S. A. Blaise [18], основываясь на результатах иммуногистохимического исследования активности S-аденозилгомоцистеин гидролазы, предположил, что гипергомоцистеинемия, вызванная дефицитом витаминов группы В в период беременности, может приводить к неравномерному накоплению Нсу в тканях мозга развивающегося плода: в большей степени в зернистом слое мозжечка, пирамидном слое СА1 гиппокампа, стриатуме и субвентрикулярной зоне, выстилающей боковой желудочек мозга крыс, т. е. в областях, ответственных за двигательные функции, обучение и память. Накопление его в нейрональных клетках и астроцитах приводит к апоптотической гибели клеток [19].

K. Robert с соавт. [20] на основе иммуногистохимического метода выявили, что на ранних стадиях развития мозга мыши цистатионин-β-синтаза – фермент, отвечающий за превращение Нсу в цистатионин (Ctn), экспрессируется повсеместно, однако на поздних стадиях его экспрессия становится более тканеспецифичной. У взрослых особей высокий уровень экспрессии цистатионин-β-синтазы наблюдается в клетках Пуркинье и нейронах гиппокампа, низкий – в коре головного мозга, стриатуме, таламусе и спинном мозге [20]. Отмечено, что транссульфурирование в мозге – процесс незавершенный и может вызывать накопление цистатионина [21].

Вместе с тем остается неизученным влияние длительной метиониновой нагрузки и вызванной ею гипергомоцистеинемии на уровни основных компонентов пула низкомолекулярных серосодержащих соединений, а также метаболически связанных с ними компонентов пула свободных аминокислот в структурах головного мозга крыс. Такие данные позволили бы более точно оценить метаболические соотношения внутри пула и подойти к пониманию механизмов нейротоксического действия избытка Нсу.

Цель работы – исследование влияния метиониновой нагрузки на состояние пула серосодержащих аминокислот и родственных им соединений в функционально различных структурах головного мозга.

Материалы и методы исследования. В эксперименте было использовано 18 белых беспородных крыс-самцов массой 200–250 г. Крысы находились в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом, получали воду и корм в достаточном количестве. Моделирование гипергомоцистеинемии осуществляли путем внутрижелудочного введения суспензии L-метионина в 1 % крахмальном растворе (Chem-Impex Int'l Inc., USA) в дозе 1,5 г/кг дважды в сутки в течение 21 сут. Контрольная группа получала эквиобъемное количество 1 % крахмального раствора в том же режиме дозирования [22]. Эксперимент выполнен с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и одобрен комитетом по биомедицинской этике УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Декапитацию проводили через 12 ч после последнего введения метионина (Met). После декапитации на холоду извлекали головной мозг, промывали его 0,9 % NaCl и выделяли отделы –

гипоталамус, средний мозг, мозжечок, большие полушария, стриатум. Гипоталамус и стриатум извлекали полностью, в среднем мозге забирали фронтальный срез на уровне нижних бугров четверохолмия, в который частично входят ретикулярная формация, черная субстанция, околоводопроводное серое вещество и сами бугры, в мозжечке выделяли левое полушарие. Фрагмент лобной доли с левой стороны выделяли после извлечения стриатума, который определяли визуально после вхождения в полость бокового желудочка [23]. Кровь забирали в пробирки с гепарином. Плазму крови отделяли путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 15 мин.

Образцы тканей мозга гомогенизировали в 10 объемах 0,2 М раствора хлорной кислоты, содержащего 0,2 мМ норвалина (nVal), 50 мг/л ЭДТА, 50 мг/л метабисульфита натрия ($Na_2S_2O_5$). Пробы центрифугировали при 16 000 g в течение 15 мин при 4 °С, после чего супернатант немедленно отбирали и хранили до исследования при –18 °С. В хлорнокислых экстрактах ткани головного мозга определяли концентрации цистеиновой кислоты (CA), цистеинсульфиновой кислоты (CSA), серина (Ser), глицина (Gly), гипотаурина (HpTau), таурина (Tau), Met, Ctn, HCA методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с предколоночной дериватизацией *о*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции [24]. Растворы стандартов, используемые для калибровки хроматографической системы, обрабатывали аналогичным способом. Использовали колонку Zorbax Eclipse Plus C_{18} с размером частиц 3,5 мкм (размеры колонки 2,1×150 мм) и заполненную таким же сорбентом предколонку с размером частиц 5 мкм (размеры предколонки 2,1×12,5 мм). Подвижная фаза: 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 6,15, содержащий 20 мг/л ЭДТА (A); ацетонитрил/вода 7/3 (об/об) (B); метанол/вода 7/3 (об/об) (C); 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,55, содержащий 20 мг/л ЭДТА (D). Разделение – с градиентным элюированием от 3,5 до 100 % B, с изменением соотношения B/C и A/D в ходе анализа, за 69,5 мин (полный цикл до начала дериватизации следующей пробы – 81 мин); температура колонки 35 °С [24].

Определение Hcy в плазме крови проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции. Метод основан на предколоночной дериватизации SH-содержащих соединений с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом (SBD-F) [25]. Пробы плазмы смешивали с раствором N-ацетилцистеина (0,5 мМ) (внутренний стандарт) и раствором трис-(карбоксиэтил)фосфина (100 мг/мл) [26], затем инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Белки осаждали 10 % трихлоруксусной кислотой и центрифугировали при 16 000 g в течение 15 мин при 4 °С. К безбелковому супернатанту добавляли смесь для дериватизации, состоящую из 1,55 М NaOH, 0,125 М Na-боратного буфера, pH 9,5 и раствора SBD-F (1 мг/мл), которую инкубировали 1 ч при 60 °С. В систему вводили 5 мкл реакционной смеси. Растворы стандартов, используемые для калибровки хроматографической системы, обрабатывали аналогичным способом. Использовали колонку Zorbax Eclipse Plus SB C_{18} размерами 2,1×150 мм. Подвижная фаза: 0,1 М NaH_2PO_4, 17 мМ H_3PO_4, 20 мг/л ЭДТА (A); ацетонитрил/вода 7/3 (об/об) (B); скорость потока 0,2 мл/мин; температура колонки 29 °С; градиент B от 0 до 12,7 % в течение 15 мин [24]. Ввиду различных принципов пробоподготовки оба метода не могут быть реализованы в одной и той же пробе биологического материала. Определить уровни Cys и Hcy в структурах мозга не представлялось возможным. В то же время известно, что метиониновая нагрузка вызывает повышение уровня Hcy в мозге [37].

При определениях использовали прибор ВЭЖХ Agilent 1200 с 4-канальной системой подачи растворителя с вакуумным дегазатором, термостатируемым автосамплером, термостатом колонок, детектором флуоресценции. Для обработки хроматограмм использовали программу Agilent ChemStation C.01.05, для приготовления подвижных фаз – реактивы квалификации ос.ч, трижды дистиллированную воду, при пробоподготовке – центрифугу Biofuge Primo R+, лабораторную баню Daihan WiseBath WB-11.

Статистическую обработку данных проводили с применением *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок после контроля нормальности с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллифорса и Шапиро–Уилка. При отклонении распределения от нормального достоверность различий между группами использовали медианный тест Манна–Уитни, различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Взаимосвязи между исследуемыми показателя-

ми выявляли с помощью корреляционного анализа. Результаты выражали в виде среднего и стандартной ошибки (M ± m) для тканей мозга, медианы [нижней; верхней квартили] – для уровня Hcy в плазме крови и для показателей в ткани мозга, достоверно различающихся между группами только по непараметрическому тесту. Применяли пакет статистических программ Statistica 10.0 (серийный номер AXAR207F394425FA-Q).

Результаты и их обсуждение. Летальность животных опытной группы составила 5,6 %. Уровень Hcy в плазме крови крыс опытной группы составил 36,28 [32,29; 226,60] мкМ против 9,48 [8,05; 10,80] мкМ в контроле.

Нагрузка метионином привела к дисбалансу серосодержащих аминокислот и их производных в исследованных регионах мозга крыс (табл. 1, 2).

Таблица 1. **Концентрации низкомолекулярных серосодержащих и родственных соединений (нмоль/г) в среднем мозге, стриатуме и гипоталамусе крыс после метиониновой нагрузки ((среднее ± средняя ошибка) и медиана [нижняя; верхняя квартиль])**

Table 1. **Concentration of low-molecular weight sulfur-containing and related compounds (nmol/g) in midbrain, striatum and hypothalamus of rats after methionine load ((mean ± s. e. m.) and median [lower; upper quartiles])**

Показатель	Средний мозг		Стриатум		Гипоталамус	
	Контроль (n = 9)	Метионин (n = 8)	Контроль (n = 9)	Метионин (n = 8)	Контроль (n = 9)	Метионин (n = 8)
CA	1,2 ± 0,14	1,6 ± 0,21	1,7 ± 0,33	1,1 ± 0,13	7,9 ± 0,65	7,5 ± 0,35
CSA	2,8 ± 0,64	3,6 ± 0,27	1,18 [0,94; 1,32]	1,72 [1,50; 2,07]*	2,4 ± 0,16	2,2 ± 0,24
HCA	6,9 ± 1,03	6,4 ± 1,20	6,9 ± 0,83	7,4 ± 0,89	26,3 ± 2,31	27,2 ± 0,76
Ser	443,4 ± 32,82	295,7 ± 13,56*	712,6 ± 52,72	537,7 ± 48,96	340,4 ± 13,72	251,6 ± 17,0*
Gly	2451,1 ± 190,3	2077,6 ± 69,98	746,5 ± 72,85	737,5 ± 51,77	2548,9 ± 241,4	2437,0 ± 217,4
HpTau	45,51 ± 17,79	381,3 ± 74,26*	52,9 ± 4,40	1189,4 ± 189,3*	21,4 ± 1,67	200,4 ± 35,78*
Tau	2107,7 ± 176,4	2501,8 ± 176,4	6149,8 ± 374,1	8495,4 ± 520,1*	1319,5 ± 74,52	1703,5 ± 73,6*
Met	41,9 ± 2,71	135,0 ± 41,21*	37,3 ± 2,63	155,8 ± 44,29*	29,98 ± 1,22	94,4 ± 20,94*
Ctn	91,71 ± 8,191	489,5 ± 144,7*	53,1 ± 3,09	470,5 ± 136,33*	104,3 ± 17,1	945,3 ± 287,0*

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – статистически достоверные изменения по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Во всех исследованных регионах мозга возрастала концентрация Met. Наиболее выраженное ее повышение наблюдалось в стриатуме – в 4,2 раза по сравнению с контролем. Уровень Ctn также возрастал во всех регионах, степень его повышения уменьшалась в ряду большие полушария > гипоталамус > стриатум > мозжечок > средний мозг, что может свидетельствовать о сохраненной активности цистатионин-β-синтазы. Это предположение подтверждает отрицательная корреляция в гипоталамусе и больших полушариях между уровнями Met и Ser (r = –0,81; r = –0,74), в мозжечке и среднем мозге между уровнями Ser и Ctn (r = –0,73; r = –0,75) и положительная корреляция в среднем мозге, больших полушариях и стриатуме между уровнями Met и Ctn (r = 0,77; r = 0,92; r = 0,81). Имеются данные, указывающие на высокую активность этого фермента в тканях мозга животных и человека в норме [27], в частности в мозжечке и гиппокампе [28]. Показано, что диета с высоким содержанием Met вызывает активацию транссульфурирования [28]. Вероятно, активность цистатионин-β-синтазы в мозге крыс повышается после длительной метиониновой нагрузки, однако скорость процесса лимитируется именно на уровне второй реакции транссульфурирования, что согласуется с данными работы [21].

Уровень HpTau статистически достоверно повышался во всех отделах мозга. При этом его уровни снижались в ряду стриатум > большие полушария > гипоталамус > средний мозг > мозжечок, а уровень Tau имел лишь тенденцию к повышению, но статистически значимое изменение его уровня отмечалось лишь в гипоталамусе и стриатуме (в 1,3 и 1,4 раза соответственно). В среднем мозге, гипоталамусе, больших полушариях и мозжечке выявлено снижение уровня Ser примерно в 1,5 раза, в то время как в стриатуме наблюдалась лишь тенденция к его снижению. В больших полушариях снижались одновременно уровни Ser и Gly (табл. 2).

Таблица 2. **Концентрации низкомолекулярных серосодержащих и родственных соединений (нмоль/г) в больших полушариях и мозжечке крыс после метиониновой нагрузки (среднее ± средняя ошибка)**

Table 2. **Concentration of low-molecular weight sulfur-containing and related compounds (nmol/g) in hemispheres and cerebellum of rats after methionine load (mean ± s. e. m.)**

Показатель	Большие полушария		Мозжечок	
	Контроль (n = 9)	Метионин (n = 8)	Контроль (n = 9)	Метионин (n = 8)
CA	1,1 ± 0,13	0,9 ± 0,098	1,1 ± 0,13	1,7 ± 0,22*
CSA	0,7 ± 0,17	0,8 ± 0,11	3,4 ± 0,43	1,9 ± 0,21*
HCA	10,1 ± 1,72	7,0 ± 0,38	7,0 ± 0,39	8,3 ± 1,05
Ser	916,9 ± 52,04	504,4 ± 46,85*	624,8 ± 20,71	320,8 ± 25,35*
Gly	912,97 ± 57,39	735,2 ± 49,47*	638,9 ± 46,47	699,2 ± 93,48
HpTau	77,3 ± 15,06	1405,6 ± 180,02*	24,2 ± 4,06	106,5 ± 20,11*
Tau	4860,3 ± 182,66	5426,2 ± 270,06	3495,0 ± 123,05	3704,2 ± 210,07
Met	38,4 ± 2,61	118,2 ± 29,25*	29,1 ± 1,33	99,6 ± 30,14*
Ctn	26,6 ± 3,25	272,3 ± 87,10*	647,8 ± 34,97	5294,9 ± 792,85*

Нсу поступает во внеклеточную среду с помощью транспортных систем (ASC (аланин, серин и цистеин), L-транспортеров (валин, изолейцин, лейцин, тирозин, триптофан и фенилаланин), X_{AG}-транспортеров (глутамат и аспартат)) [29, 30], что может объяснять несовпадение выраженности наблюдавшихся эффектов в различных отделах мозга с выраженностью повышения уровня Met.

Значительное повышение уровня HpTau во всех отделах мозга на фоне незначительного повышения уровня Tau, возможно, обусловлено торможением гипотауриндегидрогеназы и цистеинсульфинатдекарбоксилазы. Возможно, Нсу является ингибитором этих реакций. Положительная корреляция между уровнями Ctn и HpTau (r = 0,92 в гипоталамусе, r = 0,97 в среднем мозге, r = 0,74 в больших полушариях, r = 0,89 в стриатуме) свидетельствует в пользу этого предположения.

Синтез Tau в мозжечке происходит преимущественно за счет окисления CSA, так как ее уровень понизился в 1,8 раза, CA – повысился в 1,4 раза, а синтез Tau за счет окисления HpTau, вероятно, заторможен (уровень HpTau повысился в 4,4 раза). С помощью флуоресцентных методов было показано нейротоксическое действие Нсу на нейроны мозжечка *in vitro* [31]. Апоптотическую гибель нейронов авторы связывали с чрезмерным проникновением Ca^{2+} через каналы NMDA-рецепторов, способных активироваться Нсу, и изменением митохондриального мембранного потенциала [31]. Подобные изменения были выявлены и в больших полушариях крыс [16]. Однако в больших полушариях Нсу практически не оказывал такого влияния *in vitro*, а лишь незначительно изменял митохондриальный мембранный потенциал, что связывают с особенностями активации Нсу структурных подтипов NMDA-рецепторов GluN1/GluN2B. NMDA-рецепторы подтипов GluN1/GluN2A рассматриваются как более предпочтительные нейрональные мишени Нсу [32]. Наряду с уменьшением уровня Ser происходило и снижение уровня Gly в больших полушариях. Это может объясняться тем, что Нсу частично является агонистом глутаматных сайтов и частично – антагонистом сайтов связывания глицина в NMDA-рецепторах. S. A. Lipton с соавт. [33] в своих исследованиях показали, что нейротоксические эффекты Нсу зависят от присутствия Gly. Последний необходим для вытеснения Нсу из его сайта связывания, что является основным условием для активации NMDA-каналов, однако цитотоксический эффект Нсу при этом повышается. В мозжечке же экспрессируются NMDA-рецепторы подтипов GluN2C и GluN2D, которые, вероятно, не десенситизируются Нсу [34]. Возможно, это объясняет относительно большую устойчивость больших полушарий к нейротоксическому действию Нсу [35, 36].

Заключение. Введение метионина в суммарной суточной дозе 3 г/кг в сутки может считаться адекватной моделью гипергомоцистеинемии и приводит к изменениям в содержании низкомолекулярных серосодержащих и некоторых метаболически родственных им соединений, выраженность которых различна, но однонаправленна во всех отделах мозга.

Наиболее выраженные сдвиги наблюдались в мозжечке крыс. В среднем мозге выраженность нарушения метаболизма низкомолекулярных серосодержащих соединений была несколько ниже, но во всех отделах мозга проявлялась в повышении скорости транссульфурирования и синтеза гипотаурина.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Mutations of the MTHFR gene (428C>T and [458G>T+459C>T]) markedly decrease MTHFR enzyme activity / H. Yano [et al.] // Neurogenetics. – 2004. – Vol. 5, N 2. – P. 135–140. https://doi.org/10.1007/s10048-004-0177-0

2. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population / M. Yakub [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, N 3. – P. e33222. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033222

3. Association between premature ovarian failure, polymorphisms in MTHFR and MTRR genes and serum homocysteine concentration / N. Hou [et al.] // Reproductive BioMedicine Online. – 2016. – Vol. 32, N 4. – P. 407–413. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.01.009

4. MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms and the homocysteine lowering efficacy of different doses of folic acid in hypertensive Chinese adults / X. Qin [et al.] // Nutr. J. – 2012. – Vol. 11. – Art. 2. https://doi.org/10.1186/1475-2891-11-2

5. Posttreatment with group II metabotropic glutamate receptor agonist 2R,4R-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate is only weakly effective on seizures in immature rats / J. Folbergrová [et al.] // Brain Res. – 2009. – Vol. 1273. – P. 144–154. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.045

6. Gundogdu, G. The sulfite molecule enhances homocysteine toxicity in SH-SY5Y cells / G. Gundogdu, Y. Dodurga, V. Kucukatay // Mol. Biol. Reports. – 2019. – Vol. 46, N 4. – P. 4017–4025. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04850-3

7. Ziemińska, E. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurons / E. Ziemińska, A. Stafiej, J. W. Łazarewicz // Neurochem. Int. – 2003. – Vol. 43, N 4–5. – P. 481–492. https://doi.org/10.1016/s0197-0186(03)00038-x

8. Болдырев, А. А. Почему токсичен гомоцистеин? / А. А. Болдырев // Природа. – 2009. – № 10. – С. 18–23.

9. Benz, B. Glutamate-induced homocysteic acid release from astrocytes: possible implication in glia-neuron signaling / B. Benz, G. Grima, K. Q. Do // Neuroscience. – 2004. – Vol. 124, N 2. – P. 377–386. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.067

10. Arzumanyan, E. S. Mechanisms of homocysteic acid neurotoxicity / E. S. Arzumanyan, M. S. Stepanova // Neurochem. J. – 2010. – Vol. 4, N 3. – P. 222–227. https://doi.org/10.1134/s1819712410030104

11. Махро, А. В. Влияние гомоцистеина и гомоцистеиновой кислоты на гранулярные клетки мозжечка / А. В. Махро, Е. Р. Булыгина, А. А. Болдырев // Нейрохимия. – 2006. – Т. 23, № 3. – С. 179–184.

12. Homocysteine-induced membrane currents, calcium responses and changes in mitochondrial potential in rat cortical neurons / P. A. Abushik [et al.] // J. Evol. Biochem. Physiol. – 2015. – Vol. 51, N 4. – P. 296–304. https://doi.org/10.1134/s0022093015040055

13. Bhatti, J. S. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders – a step towards mitochondria based therapeutic strategies / J. S. Bhatti, G. K. Bhatti, P. H. Reddy // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. – 2017. – Vol. 1863, N 5. – P. 1066–1077. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010

14. Severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in mice results in behavioral anomalies with morphological and biochemical changes in hippocampus / N. M. Jadavji [et al.] // Mol. Gen. Metab. – 2012. – Vol. 106, N 2. – P. 149–159. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.020

15. Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine / G. Baydas [et al.] // J. Pineal Res. – 2003. – Vol. 34, N 1. – P. 36–39. https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2003.02939.x

16. Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia / A. Arutjunyan [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Med. – 2012. – Vol. 5, N 2. – P. 179–185.

17. Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на формирование памяти и содержание биогенных аминов в гиппокампе самок крыс / А. Д. Щербицкая [и др.] // Нейрохимия. – 2017. – Т. 34, № 4. – С. 296–302.

18. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats / S. A. Blaise [et al.] // Am. J. Pathol. – 2007. – Vol. 170, N 2. – P. 667–679. https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060339

19. Sachdev, P. S. Homocysteine and brain atrophy / P. S. Sachdev // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. – 2005. – Vol. 29, N 7. – P. 1152–1161. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.06.026

20. Expression of the cystathionine-β-synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain / K. Robert [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 2003. – Vol. 51, N 3. – P. 363–371. https://doi.org/10.1177/002215540305100311

21. Finkelstein, J. D. Methionine metabolism in mammals / J. D. Finkelstein // J. Nutr. Biochem. – 1990. – Vol. 1, N 5. – P. 228–237. https://doi.org/10.1016/0955-2863(90)90070-2

22. Медведев, Д. В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс / Д. В. Медведев, В. И. Звягина, М. А. Фомина // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И. П. Павлова. – 2014. – Т. 22, № 4. – С. 42–46.

23. Glowinsky, J. Regional studies of catecholamines in the rat brainthe disposition of [^{3}H]norepinephrine, [^{3}H]dopamine and [^{3}H]dopa in various regions of the brain / J. Glowinsky, L. L. Iversen // J. Neurochem. – 1966. – Vol. 13, N 8. – P. 655–669. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1966.tb09873.x

24. Дорошенко, Е. М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлением хронической сердечной недостаточности / Е. М. Дорошенко, В. А. Снежицкий, В. В. Лелевич // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2017. – Т. 15, № 5. – С. 551–555.

25. Hyperhomocysteinemia induced by folic acid deficiency and methionine load – applications of a modified HPLC method / P. Durand [et al.] // Clinica Chimica Acta. – 1996. – Vol. 252, N 1. – P. 83–93. https://doi.org/10.1016/0009-8981(96)06325-5

26. Krijt, J. Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris(2-carboxyethyl) phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine / J. Krijt, M. Vacková, V. Kožich // Clin. Chem. – 2001. – Vol. 47, N 10. – P. 1821–1828. https://doi.org/10.1093/clinchem/47.10.1821

27. Заичко, Н. В. Уровень гидроген сульфида и состояние антиоксидантной системы в мозге крыс при изолированной гипергомоцистеинемии и ее корекции / Н. В. Заичко, П. А. Юрченко, Д. А. Фильчуков // Мед. журн. – 2016. – № 1. – С. 109–112.

28. Suppressed expression of cystathionine β-synthase and smaller cerebellum in Wistar Kyoto rats / M. Nagasawa [et al.] // Brain Res. – 2015. – Vol. 1624. – P. 208–213. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.043

29. Jiang, X. Differential regulation of homocysteine transport in vascular endothelial and smooth muscle cells / X. Jiang [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2007. – Vol. 27, N 9. – P. 1976–1983. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.148544

30. Homocysteine transport by human aortic endothelial cells: Identification and properties of import systems / B. Büdy [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 2006. – Vol. 446, N 2. – P. 119–130. https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.12.014

31. Коллапс энергетического баланса нейронов мозжечка как основа нейротоксического действия L-гомоцистеина / Л. С. Ситникова [и др.] // Биол. мембраны. – 2018. – Т. 35, № 4. – С. 261–270.

32. GluN2A subunit-containing NMDA receptors are the preferential neuronal targets of homocysteine / D. A. Sibarov [et al.] // Front. Cell. Neurosci. – 2016. – Vol. 10, N 246. – P. 1–11. https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00246

33. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-d-aspartate receptor / S. A. Lipton [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1997. – Vol. 94, N 11. – P. 5923–5928. https://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5923

34. High sensitivity of cerebellar neurons to homocysteine is determined by expression of GluN2C and GluN2D subunits of NMDA receptors / D. A. Sibarov [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2018. – Vol. 506, N 3. – P. 648–652. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.140

35. Pro-nociceptive migraine mediator CGRP provides neuroprotection of sensory, cortical and cerebellar neurons via multi-kinase signaling / P. A. Abushik [et al.] // Cephalalgia. – 2017. – Vol. 37, N 14. – P. 1373–1383. https://doi.org/10.1177/0333102416681588

36. GluN2A-NMDA receptor-mediated sustained Ca^{2+} influx leads to homocysteine-induced neuronal cell death / S. N. Deep [et al.] // J. Biol. Chem. – 2019. – Vol. 294, N 29. – P. 11154–11165. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008820

37. Neurotrophins of the fetal brain and placenta in prenatal hyperhomocysteinemia / A. V. Arutjunyan [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2020. – Vol. 85, N 2. – P. 213–223. https://doi.org /10.1134/S000629792002008X

References

1. Yano H., Nakaso K., Yasui K., Wakutani Y., Nakayasu H., Kowa H., Adachi Y., Nakashima K. Mutations of the MTHFR gene (428C>T and [458G>T+459C>T]) markedly decrease MTHFR enzyme activity. *Neurogenetics*, 2004, vol. 5, no. 2, pp. 135–140. https://doi.org/10.1007/s10048-004-0177-0

2. Yakub M., Moti N., Parveen S., Chaudhry B., Azam I., Iqbal M. P. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 3, p. e33222. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033222

3. Hou N. O., Chen S., Chen F., Jiang M., Zhang J., Yang Y., Zhu B., Bai X., Hu Y., Huang H., Xu C. Association between premature ovarian failure, polymorphisms in MTHFR and MTRR genes and serum homocysteine concentration. *Reproductive BioMedicine Online*, 2016, vol. 32, no. 4, pp. 407–413. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.01.009

4. Qin X., Li J., Cui Y., Liu Z., Zhao Z., Ge J. [et al.]. MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms and the homocysteine lowering efficacy of different doses of folic acid in hypertensive Chinese adults. *Nutrition Journal*, 2012, vol. 11, art. 2. https://doi.org/10.1186/1475-2891-11-2

5. Folbergrová J., Druga R., Tsenov G., Haugvicová R., Otáhal J. Posttreatment with group II metabotropic glutamate receptor agonist 2R,4R-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate is only weakly effective on seizures in immature rats. *Brain Research*, 2009, vol. 1273, pp. 144–154. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.045

6. Gundogdu G., Dodurga Y., Kucukatay V. The sulfite molecule enhances homocysteine toxicity in SH-SY5Y cells. *Molecular Biology Reports*, 2019, vol. 46, no. 4, pp. 4017–4025. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04850-3

7. Ziemińska E., Stafiej A., Łazarewicz J. W. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurons. *Neurochemistry International*, 2003, vol. 43, no. 4–5, pp. 481–492. https://doi.org/10.1016/s0197-0186(03)00038-x

8. Boldyrev A. A. Why toxic of homocysteine? *Priroda* [Nature], 2009, no. 10, pp. 18–23 (in Russian).

9. Benz V., Grima G., Do K. Q. Glutamate-induced homocysteic acid release from astrocytes: possible implication in glia-neuron signaling. *Neuroscience*, 2004, vol. 124, no. 2, pp. 377–386. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.067

10. Arzumanyan E. S., Stepanova M. S. Mechanisms of homocysteic acid neurotoxicity. *Neurochemical Journal*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 222–227. https://doi.org/10.1134/s1819712410030104

11. Makhro A. V., Bulygina E. R., Boldyrev A. A. Effect of homocysteine and homocysteinic acid on cerebellar granule cells. *Neirokhimiya* [Neurochemistry], 2006, vol. 23, no. 3, pp. 179–184 (in Russian).

12. Abushik P. A., Karelina T. V., Sibarov D. A., Stepanenko Y. D., Antonov S. M., Giniatullin R. A. Homocysteine-induced membrane currents, calcium responses and changes in mitochondrial potential in rat cortical neurons. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 296–304. https://doi.org/10.1134/s0022093015040055

13. Bhatti J. S., Bhatti G. K., Reddy P. H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders – a step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 2017, vol. 1863, no. 5, pp. 1066–1077. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010

14. Jadavji N. M., Deng L., Leclerc D., Malysheva O., Bedell B. J., Caudill M. A., Rozen R. Severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in mice results in behavioral anomalies with morphological and biochemical changes in hippocampus. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2012, vol. 106, no. 2, pp. 149–159. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.020

15. Baydas G., Kutlu S., Naziroglu M., Canpolat S., Sandal S., Ozcan M., Kelestimur H. Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine. *Journal of Pineal Research*, 2003, vol. 34, no. 1, pp. 36–39. https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2003.02939.x

16. Arutjunyan A., Kozina L., Stvolinskiy S., Bulygina Y., Mashkina A., Khavinson V. Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2012, vol. 5, no. 2, pp. 179–185.

17. Shcherbitskaya A. D., Milyutina Yu. P., Zaloznyaya I. V., Arutyunyan A. V., Nalivaeva N. N., Zhuravin I. A. The effects of prenatal hyperhomocysteinemia on the formation of memory and the contents of biogenic amines in the rat hippocampus. *Neirokhimiya* [Neurochemistry], 2017, vol. 34, no. 4, pp. 296–302 (in Russian).

18. Blaise S. A., Nédélec E., Schroeder H., Alberto J. M., Bossenmeyer-Pourié C., Guéant J. L., Daval J. L. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *American Journal of Pathology*, 2007, vol. 170, no. 2, pp. 667–679. https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060339

19. Sachdev P. S. Homocysteine and brain atrophy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2005, vol. 29, no. 7, pp. 1152–1161. https://doi.org/10.1016/j.pnpbpp.2005.06.026

20. Robert K., Vialard F., Thiery E., Toyama K., Sinet P. M., Janel N., London J. Expression of the cystathionine-β-synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2003, vol. 51, no. 3, pp. 363–371. https://doi.org/10.1177/002215540305100311

21. Finkelstein J. D. Methionine metabolism in mammals. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1990, vol. 1, no. 5, pp. 228–237. https://doi.org/10.1016/0955-2863(90)90070-2

22. Medvedev D. V., Zvyagina V. I., Fomina M. A. Modeling of severe hyperhomocysteinemia in rats. *Rossiiskii mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I. P. Pavlova* [Russian medical and biological bulletin named after academician I. P. Pavlov], 2014, vol. 22, no. 4, pp. 42–46 (in Russian).

23. Glowinsky J., Iversen L. L. Regional studies of catecholamines in the rat brainthe disposition of [^{3}H]norepinephrine, [^{3}H]dopamine and [^{3}H]dopa in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry*, 1966, vol. 13, no. 8, pp. 655–669. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1966.tb09873.x

24. Doroshenko E. M., Snezhitskii V. A., Lelevich V. V. Structure of the pool of free amino acids and their derivatives in plasma of patients with ishemic heart disease and chronic cardiac insufficiency. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of Grodno State Medical University], 2017, vol. 15, no. 5, pp. 551–555 (in Russian).

25. Durand P. P., Fortin L. J., Lussier-Cacan S., Davignon J., Blache D. Hyperhomocysteinemia induced by folic acid deficiency and methionine load – applications of a modified HPLC method. *Clinica Chimica Acta*, 1996, vol. 252, no. 1, pp. 83–93. https://doi.org/10.1016/0009-8981(96)06325-5

26. Krijt J., Vacková M., Kožich V. Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clinical Chemistry*, 2001, vol. 47, no. 10, pp. 1821–1828. https://doi.org/10.1093/clinchem/47.10.1821

27. Zaichko N. V., Yurchenko P. A., Fil'chukov D. A. The level of hydrogen sulphide and antioxidant system in rat brain in isolated hyperhomocysteinemia and its correction. *Meditsinskii zhurnal* [Medical journal], 2016, vol. 1, no. 55, pp. 109–112 (in Russian).

28. Nagasawa M., Ikeda H., Kawase T., Iwamoto A., Yasuo S., Furuse M. Suppressed expression of cystathionine β-synthase and smaller cerebellum in Wistar Kyoto rats. *Brain Research*, 2015, vol. 1624, pp. 208–213. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.043

29. Jiang X., Yang F., Brailoiu E., Jakubowski H., Dun N. J., Schafer A. I., Yang X., Durante W., Wang H. Differential regulation of homocysteine transport in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007, vol. 27, no. 9, pp. 1976–1983. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.148544

30. Büdy B., O'Neill R. M., DiBello P. M., Sengupta S., Jacobsen D. W. Homocysteine transport by human aortic endothelial cells: Identification and properties of import systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, vol. 446, no. 2, pp. 119–130. https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.12.014

31. Sitnikova L. S., Ivanova M. A., Stepanenko Y. D., Karelina T. V., Sibarov D. A., Abushik P. A., Antonov S. M., Giniatullin R. Collapse of neuronal energy balance as a basis of L-homocysteine neurotoxicity. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2018, vol. 12, no. 4, pp. 360–368 (in Russian).

32. Sibarov D. A., Abushik P. A., Giniatullin R., Antonov S. M. GluN2A subunit-containing NMDA receptors are the preferential neuronal targets of homocysteine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2016, vol. 10, no. 246, pp. 1–11. https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00246

33. Lipton S. A., Kim W. K., Choi Y. B., Kumar S., D'Emilia D. M., Rayudu P. V., Arnelle D. R., Stamler J. S. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-d-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, vol. 94, no. 11, pp. 5923–5928. https://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5923

34. Sibarov D. A., Giniatullin R., Antonov S. M. High sensitivity of cerebellar neurons to homocysteine is determined by expression of GluN2C and GluN2D subunits of NMDA receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, vol. 506, no. 3, pp. 648–652. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.140

35. Abushik P. A., Bart G., Korhonen P., Leinonen H., Giniatullina R., Sibarov D. A., Levonen A. L., Malm T., Antonov S. M., Giniatullin R. Pro-nociceptive migraine mediator CGRP provides neuroprotection of sensory, cortical and cerebellar neurons via multi-kinase signaling. *Cephalalgia*, 2017, vol. 37, no. 14, pp. 1373–1383. https://doi.org/10.1177/0333102416681588

36. Deep S. N., Mitra S., Rajagopal S., Paul S., Poddar R. GluN2A-NMDA receptor-mediated sustained Ca^{2+} influx leads to homocysteine-induced neuronal cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, vol. 294, no. 29, pp. 11154–11165. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008820

37. Arutjunyan A. V., Milyutina Y. P., Kerkeshko G. O., Zalozniaia I. V., Mikhel A. V., Shcherbitskaia A. D. Neurotrophins of the fetal brain and placenta in prenatal hyperhomocysteinemia. *Biochemistry (Moscow)*, 2020, vol. 85, no. 2, pp. 213–223. https://doi.org /10.1134/S000629792002008X

Информация об авторах

Новогродская Яна Иосифовна – аспирант. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: yananovogrodskaya@mail.ru. https://orcid.org/0000-0001-9505-6717

Дорошенко Евгений Михайлович – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: dgi03@mail.ru

Курбат Михаил Николаевич – канд. мед. наук, доцент, заведующий лабораторией. Гродненский государственный медицинский университет» (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vwmisha@mail.ru. https://orcid.org/0000-0001-9939-8749

Information about the authors

Yana I. Novogrodskaya – Postgraduate student. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: yananovogrodskaya@mail.ru. https://orcid.org/0000-0001-9505-6717

Yevgeny M. Doroshenko – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor, Leading Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: dgi03@mail.ru

Mikhail N. Kurbat – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vwmisha@mail.ru. https://orcid.org/0000-0001-9939-8749

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.831:616.13-007.64]-005.1-098-085/.089
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-470-479

Поступила в редакцию 16.07.2020
Received16.07.2020

Н. И. НЕЧИПУРЕНКО, Р. Р. СИДОРОВИЧ, И. Д. ПАШКОВСКАЯ, А. И. АХРЕМЧУК, Т. А. ПРОКОПЕНКО

Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Республика Беларусь

КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С АНЕВРИЗМАТИЧЕСКИМИ ВНУТРИЧЕРЕПНЫМИ КРОВОИЗЛИЯНИЯМИ

Аннотация. В статье оценены тяжесть клинического состояния и ряд биохимических показателей 51 пациента с аневризматическим внутричерепным кровоизлиянием (ВЧК) на момент госпитализации и после проведения нейрохирургического лечения, включавшего наряду со стандартной терапией использование сульфата магния. Так, на момент госпитализации у 75 % пациентов контрольной группы и у 50 % основной установлен церебральный сосудистый спазм по данным транскраниальной допплерографии, выявлены активация процессов перекисного окисления липидов, снижение активности супероксиддисмутазы, увеличение содержания фактора роста эндотелия сосудов и высокочувствительного С-реактивного белка (СРБ) при уменьшении уровня стабильных продуктов обмена монооксида азота. У пациентов основной группы после нейрохирургического лечения и курсового применения сульфата магния отмечалось статистически значимое улучшение клинического состояния по шкале Ханта–Хесса и модифицированной шкале Фишера, а также увеличение баллов по шкале комы Глазго при нормализации показателей про-, антиоксидантного состояния крови. В то же время у пациентов обеих групп сохранялись высокое содержание высокочувствительного СРБ и низкий уровень нитратов/нитритов в крови. Следовательно, использование сульфата магния в дополнение к стандартной терапии способствует улучшению клинического состояния пациентов с ВЧК и повышению антиоксидантного потенциала крови в послеоперационном периоде.

Ключевые слова: разорвавшиеся артериальные аневризмы, сосудистый спазм, сульфат магния, перекисное окисление липидов, нитраты/нитриты, высокочувствительный С-реактивный белок

Для цитирования: Коррекция метаболических нарушений у пациентов с аневризматическими внутричерепными кровоизлияниями / Н. И. Нечипуренко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 470–479. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-470-479

Natalia I. Nechipurenko, Ryszard R. Sidorovich, Irina D. Pashkouskaya, Anton I. Ahremchuk, Tatiana A. Prokopenko

Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Republic of Belarus

CORRECTION OF METABOLIC DISORDERS IN PATIENTS WITH ANEURYSMAL INTRACRANIAL HEMORRHAGES

Abstract. The article presents data assessment of the severity of the clinical condition and a number of biochemical parameters in 51 patients with aneurysmal intracranial hemorrhage on the 10th day, on average, after the rupture of the arterial aneurysm and after treatment with the additional use of magnesium sulfate to standard therapy in the postoperative period. It is shown, that at the time of hospitalization, 75 % of patients in the control group and 50 % of patients in the main group had cerebral vascular spasm according to transcranial dopplerography; activation of lipid peroxidation processes, a decrease in superoxide dismutase activity, an increase in the content of vascular endothelial growth factor and highly sensitive C-reactive protein (CRP) with a decrease in the level of stable nitrogen monoxide exchange products were detected. A statistically significant improvement in the clinical condition of patients on the Hunt-Hess scale, the modified Fisher scale, and an increase in the score on the Glasgow coma scale with normalization of pro- and antioxidant status of the blood were revealed in the main group after neurosurgical treatment and course use of magnesium sulfate. At the same time, high levels of highly sensitive CRP and low levels of nitrates/nitrites in the patients blood of both groups are maintained. Consequently, the additional use of magnesium sulfate improves the clinical condition of patients with intracranial hemorrhage and increases the antioxidant potential of the blood in the postoperative period.

Keywords: ruptured arterial aneurysms, vascular spasm, magnesium sulfate, lipid peroxidation, nitrates/nitrites, highly sensitive C-reactive protein

For citation: Nechipurenko N. I., Sidorovich R. R., Pashkouskaya I. D., Ahremchuk A. I., Prokopenko T. A. Correction of metabolic disorders in patients with aneurysmal intracranial hemorrhages. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 470–479 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-470-479

Введение. Внутричерепное кровоизлияние (ВЧК) в настоящее время считается одним из самых серьезных заболеваний центральной нервной системы. К этой тяжелой патологии мозга часто приводят болезни артерий и вен различного калибра, сосудистые аневризмы и мальформации, амилоидная ангиопатия у лиц пожилого возраста и разнообразные нарушения системы гемостаза [1]. Возникновение внутримозгового и субарахноидального кровоизлияния (САК) вследствие разрыва артериальной аневризмы (АА) сопряжено с резкой активацией системы гемостаза, физиологический смысл которой состоит в остановке кровотечения [2]. Повреждение гематоэнцефалического барьера с формированием отека вокруг гематомы вызвано прорывом во внесосудистое пространство тромбина, гемоглобина, ионов железа из разорвавшегося сосуда и развитием воспалительного ответа на данные компоненты крови [3].

Сосудистый спазм (СС) и следующий за ним отсроченный ишемический неврологический дефицит являются основными причинами неблагоприятных последствий у пациентов с разрывами АА. В патогенетических механизмах сокращения церебральных артерий установлено участие таких факторов, как Ca^{2+}-зависимое сокращение гладкомышечных клеток церебральных артерий, обусловленное значительным повышением внутричерепного давления, воздействием биологически активных веществ на трансмембранные каналы, активацией реакций воспаления и перекисного окисления липидов [2]. Так, в экспериментальных и клинических исследованиях было продемонстрировано, что объем крови с продуктами распада эритроцитов и гемоглобина, излившейся при САК, играет существенную роль в риске развития спазма церебральных сосудов [4, 5]. Оксигемоглобин является вазоактивным веществом, и снижение его концентрации при возрастании уровня дезоксигемоглобина в спинномозговой жидкости (СМЖ) при САК коррелирует с развитием вазоспазма [6]. Свободные радикалы, образующиеся вследствие воздействия крови из разорвавшейся аневризмы и продуктов распада гемоглобина, действуют как вазоконстриктор и играют значимую роль в опосредовании многих звеньев развития СС [7]. Так, показано, что концентрация в плазме гидропероксидов сложных эфиров холестерина, образующихся в процессе перекисного окисления липидов, была повышена и достигала пика через 5 сут после развития САК. Кроме того, возросшие их уровни были связаны с повышенной смертностью и риском развития вазоспазма и коррелировали со шкалой исходов Глазго [8].

Эндотелиальный релаксирующий фактор, такой как оксид азота (NO), играет центральную роль в обеспечении вазодилатации при спазме сосудов [9]. Поскольку NO – это диффундирующий свободнорадикальный газ с периодом полураспада в секундах и на сегодняшний день не существует эффективного метода для точного его обнаружения и измерения *in vivo*, многие исследователи сосредоточились на поиске его метаболитов. В работе [10] было показано повышение уровня NOx в СМЖ в первые 24 ч после САК, который постепенно уменьшался, а также были выявлены корреляционные связи между общей концентрацией нитритов/нитратов и уровнем оксигемоглобина в СМЖ. При разрыве АА с развитием САК, СС и формированием очагов ишемии в условиях ацидоза происходит образование из монооксида азота повышенного количества активных форм кислорода, в частности пероксинитрита, который повреждает клеточные мембраны, ДНК и блокирует тканевое митохондриальное дыхание [11]. Наряду с этим при развитии СС снижается концентрация NO в нейронах и гладкомышечных клетках церебральных артерий, что связано с падением внутриклеточной концентрации АТФ и L-карнитина [2].

Ключевым регулятором ангиогенеза для эндотелиоцитов является фактор роста эндотелия сосудов (*англ.* Vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A), который индуцируется в макрофагах, Т-клетках, астроцитах, гладкомышечных клетках, кардиомиоцитах, эндотелии, кератиноцитах. Он блокирует апоптоз эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, индуцирует протеиназы, усиливает проницаемость сосудов. Ингибирование активности VEGF-A запускает апоптоз эндотелиоцитов, что снижает образование новых сосудистых коллатералей, усугубляя церебральную ишемию [12, 13]. В то же время известно, что гипоксия является одной из основных причин активации VEGF-A. В связи с этим необходимо дальнейшее изучение роли VEGF-A в формировании АА, а также его участия в развитии церебрального СС при аневризматическом ВЧК.

Все большее количество научных данных свидетельствует о ключевой роли воспаления в патогенезе вторичных нарушений головного мозга при САК. Продемонстрировано, что лейкоцитоз

и лихорадка связаны с худшими исходами при САК [14, 15]. Кроме того, уровни IL-6 и хемотаксического белка-1 моноцитов в СМЖ выше у пациентов, у которых развивается вазоспазм [16]. Измерения в желудочках цистерны у пациентов с разорванными и неразорвавшимися аневризмами показали, что IL-8 и E-селектин являются маркерами воспаления. Воспалительная реакция после аневризматического САК достигает пика на 5–7-е сутки после разрыва и остается в значительной степени компартментированной в ЦНС [17].

До настоящего времени вопрос о возможности применения препаратов магния в профилактике и лечении СС при САК остается дискутабельным [18, 19].

Экспериментальные исследования показали, что $MgSO_4$ ингибирует высвобождение возбуждающих аминокислот, блокирует рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA) и предотвращает поступление кальция в клетку [20]. Магний также увеличивает деформируемость эритроцитов, что может уменьшить возникновение церебрального вазоспазма и снизить нейрональное повреждение [21, 22]. Следовательно, изучение вклада различных метаболических процессов в патогенетическую структуру аневризматического САК и развитие СС, который развивается от 3 до 14 сут после разрыва АА и в послеоперационном периоде, позволит установить некоторые биохимические закономерности этого сложного и многоэтапного патологического состояния.

Цель исследования – изучить у пациентов с аневризматическими внутричерепными кровоизлияниями изменение ряда биохимических показателей на момент госпитализации и после проведенного лечения, включавшего наряду со стандартной терапией использование блокатора NMDA-рецепторов – сульфата магния.

Материалы и методы исследования. В исследование вошел 51 пациент с разорвавшимися АА в остром периоде САК (4–21-е сутки) в возрасте 52,1 ± 12,9 года, поступивший в нейрохирургические отделения РНПЦ неврологии и нейрохирургии. Всем пациентам выполняли микрохирургическое клипирование аневризмы и проводили стандартное лечение согласно клиническим протоколам «Диагностика и лечение пациентов с нетравматическими внутричерепными кровоизлияниями», утвержденным Постановлением МЗ РБ от 01.06.2017 г. № 55.

В зависимости от полученного лечения сформированы две группы пациентов. В основную группу вошли 27 пациентов в возрасте 52,3 ± 14,8 года, из них 9 (33 %) мужчин и 18 (67 %) женщин, оперированных на 10-е (6–12-е) сутки после разрыва АА. Размер АА составил 6,3 ± 2,1 мм. Пациенты основной группы дополнительно к стандартному лечению 1 раз в сутки (6–9 инъекций) получали 10 мл 25 %-ного р-ра сульфата магния, разведенного в 250 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия, внутривенно капельно под контролем АД.

Контрольную группу составили 24 пациента в возрасте 51,8 ± 10,8 года, из них 10 (42 %) мужчин и 14 (58 %) женщин, оперированных на 10-е (7–13-е) сутки после разрыва АА и развития САК. По данным КТ-ангиографии, максимальный размер аневризмы у этих пациентов составил 7,3 ± 2,1 мм.

Изначально пациенты обеих групп не различались ($p > 0,05$) между собой по возрасту, полу, размеру и локализации аневризм, а также по количеству дней, прошедших с момента разрыва АА до ее хирургического лечения.

Для сравнения с нормальными показателями обследовано также 22 практически здоровых добровольца (5 мужчин и 17 женщин), средний возраст которых составил 44,5 ± 12,3 года.

У всех пациентов в до- и послеоперационном периоде оценивали неврологический статус, тяжесть САК по шкале Ханта–Хесса. Для оценки угнетения уровня сознания пациентов применяли шкалу комы Глазго (ШКГ), для оценки риска развития церебрального СС после ВЧК при первичной КТ головного мозга (данные анамнеза) – модифицированную шкалу Фишера.

Для определения размеров, локализации аневризмы и внутримозговых кровоизлияний выполняли спиральную компьютерную томографическую ангиографию (СКТ-АГ) на аппарате Discovery CT750HD.

Для оценки СС при поступлении в стационар и на момент выписки проводили исследования линейных скоростей кровотока и рассчитывали индекс Линдегаарда (ИЛ) с помощью ультразвукового дуплексного сканирования (УЗДС) экстракраниальных отделов магистральных артерий головы и транскраниального дуплексного сканирования на ультразвуковом аппарате HD 11 XE (Philips). Легкую степень выраженности церебрального СС устанавливали при увеличении пиковой систо-

лической скорости кровотока (Vps) в М1 сегменте средней мозговой артерии (СМА) до 130–160 см/с и ИЛ менее 3. Увеличение Vps от 160 до 240 см/с, а ИЛ от 3 до 6 считали умеренным СС, более 240 см/с и ИЛ свыше 6 – выраженным.

Биохимические исследования включали определение концентрации продуктов, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-П) в сыворотке, по методике, модифицированной В. А. Костюком [23]. Активность супероксиддисмутазы в цельной крови определяли по реакции супероксидзависимого окисления кверцетина [24], концентрацию стабильных продуктов обмена монооксида азота (нитратов/нитритов) – с помощью реактива Грисса, концентрацию высокочувствительного С-реактивного белка (вчСРБ) – на биохимическом анализаторе AU 400 фирмы Olympus (Япония–США) с использованием реагентов производства Olympus, концентрацию фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови – методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA тест-наборами Fine Test производства Wuhan Fine Biotech Co., Ltd (Китай) на иммуноферментном анализаторе BioTek.

При статистической обработке полученных данных применяли программу Statistica 10.0. При нормальном распределении данных вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение (M ± SD), при распределении, отличном от нормального, – медиану (Me) и интервал между 25-й и 75-й процентилями. Сравнения проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента для зависимых и независимых групп, критерия Манна–Уитни либо критерия Вилкоксона. Сравнение двух независимых групп по одному качественному признаку выполняли с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса. Статистически значимыми являлись результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В основной группе у большинства (15 (55 %)) пациентов тяжесть состояния по шкале Ханта–Хесса при поступлении в стационар была II степени, у 8 (30 %) – III степени. По данным СКТ-АГ определена вероятность развития вазоспазма по модифицированной шкале Фишера у 22 пациентов основной группы на момент разрыва АА (данные анамнеза): у 8 (36 %) человек – II степени, у 8 (36 %) – III, у 3 (14 %) – IV степени. До операции (на 10-е (6–12-е) сутки после разрыва АА) вероятность развития СС в группе уменьшилась: у 7 (44 %) человек – I степени, у 4 (25 %) – II, у 3 (19 %) – III, у 2 (12 %) пациентов – IV степени.

В контрольной группе пациентов при поступлении в стационар тяжесть состояния II степени по шкале Ханта–Хесса определялась у большинства (16 (67 %)) обследуемых. По данным СКТ-АГ установлена вероятность развития вазоспазма по модифицированной шкале Фишера – у 17 пациентов контрольной группы на момент разрыва АА (данные анамнеза), у 10 (59 %) пациентов – III степени, у 2 (12 %) – IV степени. До операции (на 10-е (7–13-е) сутки после разрыва АА) установлена вероятность развития СС по данной шкале: у 8 (47 %) человек – I степени, у 3 (18 %) – II, у 5 (29 %) – III, у 1 (6 %) пациента – IV степени.

При анализе результатов по шкалам тяжесть клинического состояния пациентов в сравниваемых группах до начала лечения в основной и контрольной группах не различалась ($p > 0,05$): средний балл по шкале Ханта–Хесса в основной группе составил 2,1 ± 0,66, в контрольной группе – 2,3 ± 0,79; средний балл по ШКГ – 14,4 ± 0,67 и 14,5 ± 0,76 соответственно. Массивность кровоизлияния по модифицированной шкале Фишера, оценивающей вероятность развития симптоматического СС, в основной группе в среднем составила 1,92 ± 1,0 балла, в контрольной группе – 2,07 ± 1,1 балла (в среднем II степень – риск вазоспазма 15–33 %) (табл. 1).

Таблица 1. **Балльная оценка состояния пациентов обеих групп по различным шкалам**

Table 1. **Score assessment of the both groups patients on various scales**

Клиническая шкала	Основная группа		*p*	Контрольная группа		*p*
	До лечения	После лечения		До лечения	После лечения	
Ханта–Хесса	2,1 ± 0,66	1,33 ± 0,6	0,001	2,3 ± 0,79	1,9 ± 1,1	0,29
Ком Глазго	14,4 ± 0,67	14,8 ± 0,42	0,001	14,5 ± 0,76	14,5 ± 0,99	0,83
Фишера (модифицированная)	1,92 ± 1,0	1,46 ± 0,8	0,027	2,07 ± 1,1	1,79 ± 1,1	0,104

Примечание. Для зависимых групп использован *t*-критерий Стьюдента, *p* – статистическая значимость различий между данными до и после лечения.

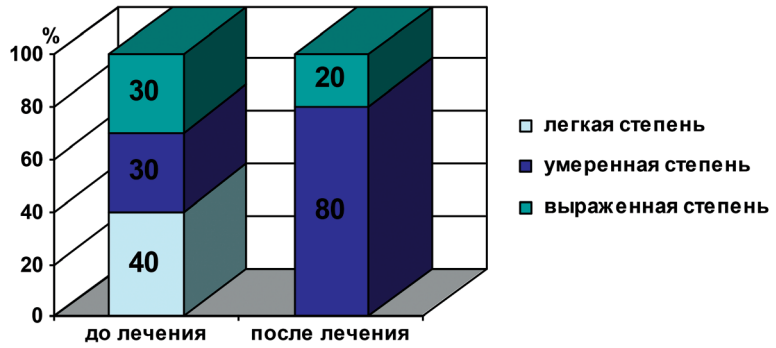


Рис. 1. Церебральный СС у пациентов основной группы до и после лечения по данным УЗДС

Fig. 1. Cerebral SS in the main group patients before and after treatment according to UZDS

У пациентов основной группы, оперированных на 10-е (6–12-е) сутки после разрыва АА, на момент выписки из стационара установлено статистически значимое улучшение клинического состояния по изученным шкалам. Показано снижение баллов по шкале Ханта–Хесса и модифицированной шкале Фишера после проведенного сочетанного лечения относительно данных до лечения. Также достоверно увеличились баллы по ШКГ после проведенного лечения (табл. 1).

У пациентов контрольной группы, оперированных на 10-е (7–13-е) сутки после разрыва АА и развития ВЧК, не установлено достоверной разницы баллов по вышеуказанным шкалам после проведенного стандартного лечения (табл. 1).

По данным УЗДС, в основной группе на 10-е (6–12-е) сутки после разрыва АА у 10 (50 %) из 20 обследованных выявлен СС как на стороне разрыва АА, так и на контрлатеральной стороне. Из них у 4 (40 %) пациентов СС был легкой степени, у 3 (30 %) – умеренной, у 3 (30 %) – выраженной. При выписке из стационара после проведенного комплексного лечения также у 10 (50 %) у пациентов основной группы сохранялись повышенными значения Vps по СМА и ИЛ на стороне разрыва АА и контрлатеральной стороне относительно аналогичных показателей у здоровых лиц: у 8 (80 %) из них выявлена умеренная степень СС ($\chi^2 = 3{,}23$, $p = 0{,}072$) по сравнению с данными до нейрохирургического лечения, у 2 (20 %) – выраженный вазоспазм (рис. 1).

По данным УЗДС, выполненной у 12 пациентов контрольной группы на 10-е (7–13-е) сутки после разрыва АА, церебральный СС на момент госпитализации на стороне разрыва АА, либо на контрлатеральной стороне, либо с обеих сторон выявлен у 9 (75 %) пациентов: у 2 (22 %) – легкой степени, у 5 (56 %) – умеренной, у 2 (22 %) – выраженной. На момент выписки из стационара у пациентов контрольной группы выявлена нормализация ИЛ на контрлатеральной стороне при сохранении повышенных значений Vps по СМА на заинтересованной и контрлатеральной сторонах и повышенных значений ИЛ на стороне разрыва АА по сравнению с таковыми у здоровых лиц. При выписке из стационара УЗДС признаки СС определены у 8 (67 %) пациентов: у 1 (12,5 %) – легкой степени, у 6 (75 %) – умеренной ($\chi^2 = 0$, $p = 1{,}0$), у 1 (12,5 %) – выраженной (рис. 2).

Следовательно, по данным УЗДС, в основной группе до лечения СС диагностирован у 50 % пациентов, после проведенного лечения с дополнительным применением сульфата магния СС – у такого же количества (50 %) пациентов. В контрольной группе СС до лечения выявлен у 75 % пациентов, после проведенного стандартного лечения – у 67 % пациентов.

Результаты биохимического исследования пациентов с ВЧК основной и контрольной групп до нейрохирургического лечения свидетельствуют о том, что в среднем на 10-е сутки после разрыва АА у этих пациентов, в отличие от здоровых лиц, развивается дисбаланс про-, антиоксидантной систем с возрастанием концентрации ТБК-П ($p = 0{,}003$ и $p = 0{,}018$) на фоне снижения активности СОД в крови ($p = 0{,}05$ и $p = 0{,}004$) (табл. 2). Нарастающая воспалительная реакция вследствие выраженного геморрагического повреждения головного мозга у пациентов характеризовалась увеличением концентрации вчСРБ, который в обеих группах оказался достоверно выше ($p = 0{,}0004$ и $p = 0{,}009$), чем у здоровых лиц. В то же время в контрольной группе установлено достоверное ($p = 0{,}009$) снижение концентрации стабильных продуктов монооксида азота (до 18,6 (15,8–23,8) мкмоль/л против 25 (19,5–26) мкмоль/л у здоровых лиц), что, вероятно, свиде-

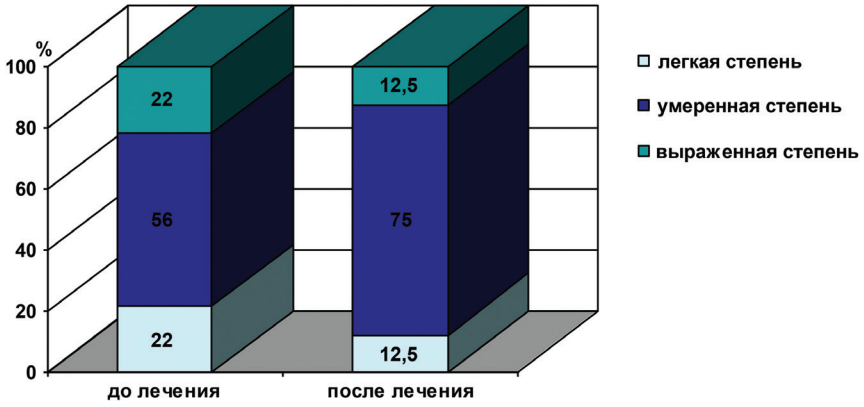


Рис. 2. Церебральный СС у пациентов контрольной группы до и после лечения по данным УЗДС

Fig. 2. Cerebral SS in the control group patients before and after treatment according to UZDS

Таблица 2. **Биохимические показатели крови у пациентов обеих групп до и после лечения в сравнении с данными здоровых лиц, Me (квартили)**

Table 2. **Biochemical parameters in the blood of patients of both groups before and after treatment in comparison with data from healthy individuals, Me (quartiles)**

Показатель	Здоровые лица	Основная группа (n = 23)		Контрольная группа (n = 17)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
ТБК-П, мкмоль/л	1,7 (1,5–2,1) (n = 22)	2,3 (1,9–3,0) p = 0,003	1,9 (1,5–3,5)	2,4 (1,8–2,8) p = 0,018	2,5 (2,2–3,2) p = 0,001
СОД, Е/мл	105,3 (88,1–123) (n = 22)	89,9 (63–107,5) p = 0,05	89,8 (72,3–126,5)	73,5 (61,7–87,8) p = 0,004	95,3 (76–106,3)
Нитраты и нитриты, мкмоль/л	25,0 (19,5–26,0) (n = 22)	20,2 (17,8–28,2)	16,1 (14,2–24,3) p = 0,006	18,6 (15,8–23,8) p = 0,009	19,5 (14–24) p = 0,029
вчСРБ, мг/л	1,1 (0,5–2,1) (n = 22)	13,5 (2,0–17,7) p = 0,0004	6,9 (4,4–22,6) p = 0,00009	6,1 (1,8–27,4) p = 0,009	14,7 (6,2–24,5) p = 0,001
VEGF-A, пг/мл	53,7 (37,3–66,3) (n = 14)	85,7 (31,3–585,4)	54,9 (27,1–125,6)	87,5 (31,3–113)	62,2 (28,2–271,8)

Примечание. p – сравнение с данными здоровых лиц по U-критерию Манна–Уитни.

тельствует о недостаточности синтеза эндотелиального NO, опосредующего расслабление сосудистой стенки и способствующего развитию СС у 75 % пациентов этой группы.

В литературе имеются сведения об экспериментальных и ранних клинических исследованиях, которые согласуются с вовлечением NO в развитие отсроченного церебрального вазоспазма после САК. Так, известно, что аневризматическое САК нарушает регуляцию мозгового кровотока. Оксигемоглобин, постепенно высвобождаясь из сгустков крови, окружающих проводящие артерии, поглощает NO и разрушает nNOS-содержащие нейроны. Это приводит к снижению уровня NO, вызывая вазоконстрикцию артерий, которая инициирует СС. Сужение артерий увеличивает напряжение сдвига и стимулирует eNOS, что в нормальных условиях привело бы к увеличению выработки NO и расширению артерий. Однако этого не происходит из-за транзиторной дисфункции eNOS, вызванной повышенным уровнем эндогенного ингибитора NOS – асимметричного диметиларгинина (АДМА). Повышенный уровень АДМА является результатом снижения элиминации вследствие ингибирования АДМА-гидролизующего фермента метаболитами гемоглобина и билирубин-окисленными фрагментами в артериях при спазме. Дисфункция eNOS поддерживает вазоспазм до тех пор, пока уровень АДМА не снизится и не восстановится активность эндотелиальных клеток, генерирующих NO [25].

Результаты исследования VEGF-A в сыворотке крови показали, что у пациентов до начала нейрохирургического лечения (на 10-е сутки после разрыва АА) в обеих группах уровень VEGF-A имел тенденцию к увеличению до 85,7 (31,3–585,4) и 87,5 (31,3–113) пг/мл соответственно относи-

тельно такового у здоровых лиц (53,7 (37,3–66,3) пг/мл), что обусловлено напряженностью фактора ангиогенеза и повышением образования новых сосудистых коллатералей. Согласно литературным данным, нарастание VEGF в крови можно считать следствием активации эндотелиальных прогениторных клеток. VEGF, взаимодействуя с ними через специфические тирозинкиназные рецепторы, стимулирует образование новых сосудов, увеличивает сосудистую проницаемость и активирует вазодилатацию путем усиления синтеза веществ, вызывающих расслабление гладкомышечных клеток сосудистых стенок, в первую очередь NO [26] и простациклина [27].

На 10-е сутки после разрыва АА у пациентов выявлены достоверные отрицательные корреляционные связи между Vps по СМА и VEGF-A (r_s = –0,73; p = 0,038) и между ИЛ и VEGF-A (r_s = –0,76; p = 0,027), что свидетельствует о линейной зависимости снижения скоростных характеристик кровотока по церебральным артериям от активации фактора роста эндотелия сосудов.

На момент выписки из стационара у пациентов обеих групп установлена более высокая концентрация вчСРБ (p = 0,00009 и p = 0,001), чем у здоровых лиц. После проведенного комплексного лечения показатели про- и антиоксидантной систем крови у пациентов основной группы нормализовались. В контрольной группе на момент выписки из стационара выявлено повышение активности СОД при сохранении высокой концентрации ТБК-П. В основной группе концентрация стабильных продуктов обмена монооксида азота после лечения составила 16,1 (14,2–24,3) мкмоль/л (p = 0,006), в контрольной группе – 19,5 (14–24) мкмоль/л (p = 0,029), что, вероятно, свидетельствует о недостаточности синтеза эндотелиального NO, опосредующего расслабление сосудистой стенки и обусловливает поддержание СС у пациентов в послеоперационном периоде. Возможно, что после нейрохирургического лечения низкие уровни NO могут способствовать не только нормализации окислительно-восстановительных процессов в митохондриях, оптимизируя транспорт электронов и ускоряя тканевое дыхание, но и образованию супероксид-аниона, что было показано в работе [28].

Заключение. Таким образом, анализ метаболических нарушений у пациентов с ВЧК на 10-е сутки после разрыва АА продемонстрировал развитие у них про-, антиоксидантного дисбаланса, выраженных признаков системного воспаления в виде повышенного уровня вчСРБ и низкое содержание стабильных продуктов обмена монооксида азота в крови по сравнению с таковыми у здоровых лиц, что характеризует особенности развития ВЧК в эти сроки наблюдения. Внутривенное введение раствора сульфата магния для коррекции неврологических нарушений у пациентов приводит не только к клиническому улучшению, но и к нормализации показателей про-, антиоксидантной систем крови, что способствует в дальнейшем сохранению функции таких биологических макромолекул, как ДНК, белки, углеводы, липиды. Введение сульфата магния позволяет минимизировать последствия тяжелых клинико-метаболических нарушений, обусловленных развитием ВЧК аневризматического генеза.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Intracerebral haemorrhage profiles are changing: results from the Dijon population-based study / Y. Béjot [et al.] // Brain. – 2013. – Vol. 136, N 2. – P. 658–664. https://doi.org/10.1093/brain/aws349

2. Крылов, В. В. Патогенез сосудистого спазма и ишемии головного мозга при нетравматическом субарахноидальном кровоизлиянии вследствие разрыва церебральных аневризм / В. В. Крылов, А. А. Калинкин, С. С. Петриков // Неврологический журн. – 2014. – Т. 19, № 5. – С. 4–12.

3. Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage / R. F. Keep [et al.] // Fluids Barriers CNS. – 2014. – Vol. 11, N 1. – Art. 18. https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-18

4. Delayed clot removal and experimental vasospasm / Z. D. Zhang [et al.] // Acta Neurochir. Suppl. – 2001. – Vol. 77. – P. 33–35. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6232-3_8

5. Fisher, C. M. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrage visualized by computerized tomographic scanning / C. M. Fisher, J. P. Kistler, J. M. Davis // Neurosurgery. – 1980. – Vol. 6, N 1. – P. 1–9. https://doi.org/10.1227/00006123-198001000-00001

6. Mishizawa, S. Signaling mechanisms in cerebral vasospasm / S. Mishizawa, I. Laher // Trends Cardiovasc. Med. – 2005. – Vol. 15, N 1. – P. 24–34. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2004.12.002

7. Macdonald, R. L. Cerebral vasospasm and free radicals / R. L. Macdonald, B. K. Weir // Free Radic. Biol. Med. – 1994. – Vol. 16, N 5. – P. 633–643. https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90064-7

8. Increased levels of plasma cholesteryl ester hydroperoxides in patients with subarachnoid hemorrhage / M. C. Polidon [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1997. – Vol. 23, N 5. – P. 762–767. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00053-1

9. Kolias, A. G. Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage putative mechanisms and novel approaches / A. G. Kolias, J. Sen, A. Belli // J. Neurosci. Res. – 2009. – Vol. 87, N 1. – P. 1–11. https://doi.org/10.1002/jnr.21823

10. Cerebrospinal fluid nitrite/nitrate correlated with oxyhemoglobin and outcome in patients with subarachnoid hemorrhage / K. Rejdak [et al.] // J. Neurol. Sci. – 2004. – Vol. 219, N 1–2. – P. 71–76. https://doi.org/10.1016/j.jns.2003.12.011

11. Phosphodiesterase 5 inhibition attenuates cerebral vasospasm and improves functional recovery after experimental subarachnoid hemorrhage / B. H. Han [et al.] // Neurosurgery. – 2012. – Vol. 70, N 1. – P. 178–187. https://doi.org/10.1227/neu.0b013e31822ec2b0

12. Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms / J. Frösen [et al.] // Acta Neuropathol. – 2012. – Vol. 123, N 6. – P. 773–786. https://doi.org/10.1007/s00401-011-0939-3

13. Фатеева, В. В. Маркеры эндотелиальной дисфункции при хронической ишемии мозга / В. В. Фатеева, О. В. Воробьева // Журн. неврол. и психиатр. – 2017. – № 4. – С. 107–111.

14. Inflammation in intracerebral hemorrhage: from mechanisms to clinical translation / Y. Zhou [et al.] // Prog. Neurobiol. – 2014. – Vol. 115. – P. 25–44. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.003

15. The blood leukocyte count and its prognostic significance in subarachnoid hemorrhage / F. Maiuri [et al.] // J. Neurosurg. Sci. – 1987. – Vol. 31, N 2. – P. 45–48.

16. Cisternal CSF levels of cytokines after subarachnoid hemorrhage / P. Gaetani [et al.] // Neurol. Res. – 1998. – Vol. 20, N 4. – P. 337–342. https://doi.org/10.1080/01616412.1998.11740528

17. Compartmentalisation of the inflammatory response following aneurysmal subarachnoid haemorrhage / Y. Z. Al-Tamimi [et al.] // Cytokine. – 2019. – Vol. 123. – P. 154778. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154778

18. Role magnesium in the reduction of ischemic depolarization and lesion volum after experimental subarachnoid hemorrhage / W. M. van Den Berg [et al.] // J. Neurosurg. – 2002. – Vol. 97, N 2. – P. 416–422. https://doi.org/10.3171/jns.2002.97.2.0416

19. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the AHA/ASA Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vasrular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdiscriplinary Working Groups / H. P. Adams [et al.] // American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as on educational tool for neurologists. – 2007. – Vol. 115, N 20. – P. 478–534. https://doi.org/10.1161/circulationaha.107.181486

20. Feng, D. F. Effects of magnesium sulfate on traumatic brain edema in rats / D. F. Feng, Z. A. Zhu, Y. C. Lu // Chin. J. Traumatol. – 2004. – Vol. 7, N 3. – P. 148–152.

21. Magnesium sulfate in the management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized, placebo-controlled, dose-adapted trial / C. Muroi [et al.] // Surg. Neurol. – 2008. – Vol. 69, N 1. – P. 33–39. https://doi.org/10.1016/j.surneu.2007.07.015

22. Magnesium sulfate: role as possible attenuating factor in vasospasm morbidity / D. M.-S. Prevedello [et al.] // Surg. Neurol. – 2006. – Vol. 65. – P. S14–S20. https://doi.org/10.1016/j.surneu.2005.11.035

23. Костюк, В. А. Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью тиобарбитуровой кислоты в анаэробных условиях / В. А. Костюк, А. И. Потапович // Вопр. мед. химии. – 1987. – Т. 33, № 3. – С. 115–118.

24. 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.

25. Pluta, R. M. Analysis of nitric oxide (NO) in cerebral vasospasm after aneursymal bleeding / R. M. Pluta, E. H. Oldfield // Rev. Recent Clin. Trials. – 2007. – Vol. 2, N 1. – P. 59–67. https://doi.org/10.2174/157488707779318062

26. Coleman, H. A. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease / H. A. Coleman, T. Mare, H. C. Parkington // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2004. – Vol. 31, N 9. – P. 641–649. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04053.x

27. Мазуров, В. И. Эндотелиальная дисфункция при метаболическом синдроме / В. И. Мазуров, В. А. Якушева // Эфферент. терапия. – 2006. – Т. 12, № 3. – С. 19–24.

28. Moncada, S. Nitric oxide and oxygen: actions and interactions in health and disease / P. S. Moncada // Redox Biol. – 2015. – Vol. 5. – P. 421. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.034

References

1. Béjot Y., Cordonnier C., Durier J., Aboa-Eboulé C., Rouaud O., Giroud M. Intracerebral haemorrhage profiles are changing: results from the Dijon population-based study. *Brain*, 2013, vol. 136, no. 2, pp. 658–664. https://doi.org/10.1093/brain/aws349

2. Krylov V. V., Kalinkin A. A., Petrikov S. S. The pathogenesis of cerebral angiospasm and brain ischemia in patients with non-traumatic subarachnoid hemorrhage due to cerebral aneurysm rupture. *Nevrologicheskii zhurnal* [Neurological journal], 2014, vol. 19, no. 5, pp. 4–12 (in Russian).

3. Keep R. F., Zhou N., Xiang J., Andjelkovic A. V., Hua Y., Xi G. Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage. *Fluids Barriers CNS*, 2014, vol. 11, no. 1, art. 18. https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-18

4. Zhang Z.-D., Yamini B., Komuro T., Ono S., Johns L., Marton L. S., Weir B., Macdonald R. L. Delayed clot removal and experimental vasospasm. *Acta Neurochirurgica Supplement*, 2001, vol. 77, pp. 33–35. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6232-3_8_

5. Fisher C. M., Kistler J. P., Davis J. M. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery*, 1980, vol. 6, no. 1, pp. 1–9. https://doi.org/10.1227/00006123-198001000-00001

6. Mishizawa S., Laher I. Signaling mechanisms in cerebral vasospasm. *Trends Cardiovascular Medicine*, 2005, vol. 15, no. 1, pp. 24–34. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2004.12.002

7. Macdonald R. L., Weir B. K. Cerebral vasospasm and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, vol. 16, no. 5, pp. 633–643. https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90064-7

8. Polidon M. C., Frei B., Rordorf G., Ogilvy C. S., Beal M. F. Increased levels of plasma cholesteryl ester hydroperoxides in patients with subarachnoid hemorrhage. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, vol. 23, no. 5, pp. 762–767. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00053-1

9. Kolias A. G., Sen J., Belli A. Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage putative mechanisms and novel approaches. *Journal of Neuroscience Research*, 2009, vol. 87, no. 1, pp. 1–11. https://doi.org/10.1002/jnr.21823

10. Rejdak K., Petzold A., Sharpe M. A., Kay A. D., Kerr M., Keir G., Thompson E. J., Giovannoni G. Cerebrospinal fluid nitrite/nitrate correlated with oxyhemoglobin and outcome in patients with subarachnoid hemorrhage. *Journal of the Neurological Sciences*, 2004, vol. 219, no. 1–2, pp. 71–76. https://doi.org/10.1016/j.jns.2003.12.011

11. Han B. H., Vellimana A. K., Zhou M. L., Milner E., Zipfel G. J. Phosphodiesterase 5 inhibition attenuates cerebral vasospasm and improves functional recovery after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 2012, vol. 70, no. 1, pp. 178–187. https://doi.org/10.1227/neu.0b013e31822ec2b0

12. Frösen J., Tulamo R., Paetau A., Laaksamo E., Korja M., Laakso A., Niemelä M., Hernesniemi J. Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathology*, 2012, vol. 123, no. 6, pp. 773–786. https://doi.org/10.1007/s00401-011-0939-3

13. Fateeva V. V., Vorob'eva O. V. Markers of endothelial dysfunction in chronic cerebral ischemia. *Zhurnal nevropatologii i psikhiatrii imeni S. S. Korsakova* [Journal of Neuropathology and Psychiatry named after S. S. Korsakov], 2017, no. 4, pp. 107–111 (in Russian).

14. Zhou Y., Wang Y., Wang J., Stetler R. A., Yang Q. W. Inflammation in intracerebral hemorrhage: from mechanisms to clinical translation. *Progress in Neurobiology*, 2014, vol. 115, pp. 25–44. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.003

15. Maiuri F., Gallicchio B., Donati P., Carandente M. The blood leukocyte count and its prognostic significance in subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery Science*, 1987, vol. 31, no. 2, pp. 45–48.

16. Gaetani P., Tartara F., Pignatti P., Tancioni F., Rodriguez R., Benedetti F. D. Cisternal CSF levels of cytokines after subarachnoid hemorrhage. *Neurological Research*, 1998, vol. 20, no. 4, pp. 337–342. https://doi.org/10.1080/01616412.1998.11740528

17. Al-Tamimi Y. Z., Bhargava D. , Orsi N. M., Teraifi A., Cummings M., Ekbote U. V., Quinn A. C., Homer-Vanniasinkam S., Ross S. Compartmentalisation of the inflammatory response following aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cytokine*, 2019, vol. 123, p. 154778. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154778

18. van den Bergh W. M., Zuur J. K., Kamerling N. A., van Asseldonk J. T. H., Rinkel G. J. E., Tulleken C. A. F., Nicolay K. Role magnesium in the reduction of ischemic depolarization and lesion volum after experimental subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*, 2002, vol. 97, pp. 416–422. https://doi.org/10.3171/jns.2002.97.2.0416

19. Adams H. P. (Jr.), del Zoppo G., Alberts M. J., Bhatt D. L., Brass L., Furlan A. [et al.]. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the AHA/ASA Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vasrular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups. *American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as on educational tool for neurologists*, 2007, vol. 115, no. 20, pp. 478–534. https://doi.org/10.1161/circulationaha.107.181486

20. Feng D.-F., Zhu Z.-A., Lu Y.-C. Effects of magnesium sulfate on traumatic brain edema in rats. *Chinese Journal of Traumatology*, 2004, vol. 7, no. 3, pp. 148–152.

21. Muroi C., Terzic A., Fortunati M., Yonekawa Y., Keller E. Magnesium sulfate in the management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized, placebo-controlled, dose-adapted trial. *Surgical Neurology*, 2008, vol. 69, no. 1, pp. 33–39. https://doi.org/10.1016/j.surneu.2007.07.015

22. Prevedello D. M.-S., Cordeiro J. G., de Morais A. L., Saucedo N. S. Jr., Chen I. B., Araújo J. C. Magnesium sulfate: role as possible attenuating factor in vasospasm morbidity. *Surgical Neurology*, 2006, vol. 65, pp. S14–S20. https://doi.org/10.1016/j.surneu.2005.11.035

23. Kostyuk V. A., Potapovich A. I. Determination of lipid peroxidation products using thiobarbituric acid in anaerobic conditions. *Voprosy meditsinskoi khimii* [Problems of medical chemistry], 1987, vol. 33, no. 3, pp. 115–118 (in Russian).

24. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Kovaleva Zh. V. A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase, based on the reaction of oxidation of quercetin. *Voprosy meditsinskoi khimii* [Problems of medical chemistry], 1990, vol. 36, no. 2, pp. 88–91 (in Russian).

25. Pluta R. M., Oldfield E. H. Analysis of nitric oxide (NO) in cerebral vasospasm after aneursymal bleeding. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 2007, vol. 2, no. 1, pp. 59–67. https://doi.org/10.2174/157488707779318062

26. Coleman H. A., Mare T., Parkington H. C. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2004, vol. 31, no. 9, pp. 641–649. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04053.x

27. Mazurov V. I., Yakusheva V. A. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome. *Efferentnaya terapiya* [Efferent therapy], 2006, vol. 12, no. 3, pp. 19–24 (in Russian).

28. Moncada S. Nitric oxide and oxygen: actions and interactions in health and disease. *Redox Biology*, 2015, vol. 5, p. 421. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.034

Информация об авторах

Нечипуренко Наталия Ивановна – д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: prof_NIN@mail.ru

Сидорович Рышард Ромуальдович – д-р мед. наук, доцент, директор Республиканского научно-практического центра неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ninh@mail.ru

Пашковская Ирина Дмитриевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: irenapass@mail.ru

Ахремчук Антон Игоревич – врач-нейрохирург. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ahremen@mail.ru

Прокопенко Татьяна Анатольевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Natalia I. Nechipurenko – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: prof_NIN@mail.ru

Ryszard R. Sidorovich – D. Sc. (Med.), Assistant Professor, Director. Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ninh@mail.ru

Irina D. Pashkovskaya – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irenapass@mail.ru

Anton I. Ahremchuk – Neurosurgeon. Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery (F. Skorina Str., 24, 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ahremen@mail.ru

Tatiana A. Prokopenko – Junior Researcher. Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus).

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
UDC 616.71-007.234-056.7
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-480-492 Received 03.06.2020

Alena V. Rudenka[1], Ema V. Rudenka[2], Volha Yu. Samokhovec[3], Katsiaryna V. Kobets[4], Pavel M. Marozik[4]

[1]Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[3]City Center for Osteoporosis and Bone-Muscular Diseases Prevention, Minsk, Republic of Belarus
[4]Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

VITAMIN D RECEPTOR GENE POLYMORPHISM, BONE MINERAL DENSITY AND 25(OH)D LEVEL IN WOMEN WITH OSTEOPOROSIS

Abstract. Vitamin D plays an important role in bone metabolism and pathology. Although the *VDR* gene is one of the most studied determinants of bone mineral density (BMD) and osteoporosis (OP), its exact effects have yet to be established. Prediction of OP and/or fracture risk, based on individual genetic profile, is of high importance. The aim of our study was to develop prognostic model for postmenopausal OP individual risk evaluation in Belarusian women, based on the analysis of *VDR* gene variants.

Case group included women with postmenopausal OP (n = 350), the control group comprised of women with normal BMD and without previous fragility fractures (n = 243). *VDR* gene ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, TaqI rs731236, FokI rs2228570 and Cdx2 rs11568820 variants were determined using TaqMan genotyping assays.

We revealed a significant association of single ApaI A/A (p = 0.045), BsmI T/T (p = 0.015) and TaqI G/G (p = 0.005) variants and their A-T-G-haplotype (OR = 4.6, p = 0.003) with increased OP risk. Together with Cdx2 rs11568820, these variants correlated with BMD ($p < 0.05$ in all cases). For the bearers of non-favorable alleles of *VDR* gene variants, the serum 25(OH)D level was significantly increased. The constructed from informative *VDR* gene variants model of individual OP risk evaluation possessed a good prognostic value (AUC = 0.79) with high sensitivity level (82.9 %) and average specificity (69.4 %). Our findings highlight the importance of analyzed *VDR* gene variants for personalized OP risk prediction.

Keywords: vitamin D, genetic risk, predictive model, gene variants, haplotype, postmenopausal osteoporosis

For citation: Rudenka A. V., Rudenka E. V., Samokhovec V. Yu., Kobets K. V., Marozik P. M. Vitamin D receptor gene polymorphism, bone mineral density and 25(OH)D level in women with osteoporosis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 480–492. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-480-492

Е. В. Руденко[1], Э. В. Руденко[2], О. Ю. Самоховец[3], Е. В. Кобец[4], П. М. Морозик[4]

[1]Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
[3]Городской центр профилактики остеопороза и болезней костно-мышечной системы, Минск, Республика Беларусь
[4]Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D С ПОКАЗАТЕЛЯМИ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ И УРОВНЕМ 25(OH)D У ЖЕНЩИН С ОСТЕОПОРОЗОМ

Аннотация. Витамин D является секостероидным гормоном, который реализует свои многочисленные клеточные эффекты, инициируя транскрипцию витамин D-зависимых генов. Несмотря на большое количество проведенных исследований, точная роль вариантов гена *VDR* с уровнем минеральной плотности костей (МПК) и риском остеопороза (ОП) до сих пор не установлена. Разработка и внедрение методики прогнозирования индивидуального риска ОП и/или костных переломов на основании генетического тестирования имеет большое значение для своевременной профилактики заболевания. Целью настоящего исследования являлась разработка прогностической модели оценки индивидуального риска развития ОП у женщин Беларуси, включающей анализ полиморфных вариантов гена *VDR*.

В исследование были включены женщины в постменопаузе с ОП (n = 350), контрольную группу составили женщины с нормальной МПК, без низкотравматических переломов (n = 243). Генотипирование вариантов ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, TaqI rs731236, FokI rs2228570 и Cdx2 rs11568820 гена *VDR* осуществляли методом ПЦР с использованием проб TaqMan.

По результатам исследования была выявлена значимая ассоциация генотипов ApaI A/A (p = 0,045), BsmI T/T (p = 0,015) и TaqI G/G (p = 0,005), а также их гаплотипа A-T-G (OR = 4,6; p = 0,003) с повышенным риском ОП. Эти же

варианты, а также Cdx2 rs11568820 коррелировали с уровнем МПК ($p < 0,05$ во всех случаях). Показано, что среди носителей неблагоприятных аллелей исследованных вариантов гена *VDR* уровень 25(OH)D в сыворотке был существенно повышен ($\beta = 4,1$; $p = 0,007$). Построенная из информативных вариантов гена *VDR* модель оценки индивидуального риска ОП имела хорошую прогностическую ценность (AUC = 0,79) с высоким уровнем чувствительности (82,9 %) и средней специфичностью (69,4 %). Полученные нами результаты подчеркивают важность проанализированных вариантов гена *VDR* для прогнозирования индивидуального риска ОП.

Ключевые слова: витамин D, генетический риск, прогнозирующая модель, варианты гена, гаплотип, постменопаузальный остеопороз

Для цитирования: Связь полиморфизма гена рецептора витамина D с показателями минеральной плотности костной ткани и уровнем 25(OH)D у женщин с остеопорозом / Е. В. Руденко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 480–492 (*на англ.*). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-480-492

Introduction. Vitamin D is a secosteroid hormone that implements its numerous cellular effects by initiating transcription of vitamin D-dependent genes. Studies of the last two decades have established that diverse biological effects of the active metabolite of vitamin D-1.25-dihydroxyvitamin D (calcitriol) are carried out by modulating the expression of genes that are mediated by interaction with the intracellular vitamin D receptor (VDR) [1]. Activation of VDR through direct interaction with $1.25(OH)_2D$ causes fast binding of the receptor to the regulatory regions of target genes, which initiates the transcription and synthesis of new mRNA molecules, translation of mRNA, synthesis of new proteins and the implementation of specific biological reactions. These reactions are specific to various tissues and range from very complex mechanisms necessary for homeostatic control of mineral metabolism to focal effects that regulate growth, differentiation, proliferation, apoptosis, adaptive and innate immune responses, and the functional activity of many types of cells [2]. One of the main functions of vitamin D is the regulation of calcium-phosphorus metabolism in the intestine and kidneys. Calcitriol promotes active cellular absorption and transport of calcium in intestine, in renal tubules it controls its own homeostasis (suppression of 1-α-hydroxylase and 24-hydroxylase stimulation), potentiates the effects of parathyroid hormone (PTH) on calcium reabsorption, and induces trans epithelial calcium transfer [1]. By binding to VDR, which is present in all types of bone cells – osteoblasts, osteocytes and osteoclasts, calcitriol has a direct effect on bone metabolism [1].

VDR is the product of the corresponding gene, the *VDR* gene, which determines its structure and functional activity. The human *VDR* gene is located on the 12th chromosome (12q12-14) and consists of 14 exons spanning about 75 kb: eight protein-coding exons (2-9), six untranslated exons (1A-1F), located on the non-coding 5′ region, and several promoter regions – DNA sequences recognized by RNA polymerase as a launching pad for the initiation of specific transcription [3]. Several substitutions in the *VDR* gene were identified, which are single nucleotide variations (SNVs). Most variants in the *VDR* gene are found in regulatory regions, such as the promoter region and the 3′-untranslated region. Changes in the regulatory region of the gene can determine the amino acid sequence of the synthesized protein and lead to functional effects such as a change in ligand affinity or DNA binding [3].

Cdx2 G-to-A (alternatively C/T, rs11568820) substitution is located in the promoter region 1e of the *VDR* gene. It is suggested that this site plays an important role in the specific transcription of the *VDR* gene in the intestine and determines the regulatory role of vitamin D in intestinal calcium absorption. Some studies have demonstrated that A-allele has greater transcriptional activity than the G-allele [4]. Allele A causes increased intestinal expression of VDR and can increase the transcription of calcium-transporting proteins, such as calbindin, channel-forming proteins of the transient receptor potential (TRP) protein superfamily, the most selective for calcium – TRPV5, TRPV6 [5]. Thus, the presence of A-allele contributes to increased absorption of calcium in the intestine and can contribute to gain in BMD. The *VDR* FokI variant (rs2228570, c.2T(A, f) > C(G, F), p.Met1Arg) is located in the coding region of the *VDR* gene (exon 2) and leads to an alternative transcription initiation site due to the replacement of thymine (T) with cytosine (C) and affects the activity of the receptor, which depends on the length of the amino acid sequence: the protein synthesized by the F allele (ACG variant) is three amino acids shorter than the product of the f allele (ATG variant) and is 1.7 times more active [6]. It was found that Caucasian postmenopausal women with FokI F/f-genotype demonstrated lower BMD compared to bearers of F/F-homozygotes [7]. The *VDR* gene BsmI and ApaI (in intron 8) and TaqI (in exon 9) variants are located at the 3′-untranslated end and are in close linkage disequilibrium (LD). These SNVs do not alter

the amino acid sequence of the encoded protein but influence gene expression, regulating mRNA stability [8]. The BsmI (rs1544410, 1024+443C>T, alternatively b>B) and TaqI (rs731236, c.1056A>G, alternatively T>t) haplotype frequencies are associated with an increased level of VDR receptor. ApaI (rs7975232, c.1025-49C>A, or a>A) variant has also been shown to be associated with the activity or expression of VDR. Though the results of the multiple studies on *VDR* gene variants association with osteoporosis (OP) risk are controversial, some studies on different populations revealed their association with BMD [9–15].

The results of the above studies indicate the important role of the vitamin D-endocrine system in the regulation of bone metabolism, though many issues in this area are not fully understood. Determination of *VDR* gene polymorphisms associated with low BMD will allow to identify individuals with high hereditary risk of early reduction in BMD long before the development of OP, and thus to conduct timely set of preventive measures in target risk groups, and also to evaluate effectiveness of therapy [16].

The aim of our study was to develop prognostic model for postmenopausal osteoporosis (PMO) risk evaluation in Belarusian women, based on the analysis of *VDR* gene variants.

Materials and methods. This study was a cross-sectional cohort study, conducted at out-patient department and inpatient clinic. Patients were recruited at Minsk City Center for Osteoporosis and Bone-Muscular Diseases Prevention and rheumatologic department of 1st Minsk city clinic (Minsk, Belarus). The study protocol was approved by the Local Research Ethics Committee of Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education. White Caucasian women were screened for participation. Inclusion criteria were: wiliness to participate in the study, female sex, established diagnosis of OP according to WHO Diagnostic Criteria [17]. Exclusion criteria: presence of other metabolic bone diseases (such as Paget's disease and osteomalacia), diseases, affecting bone metabolism (such as endocrine osteopathies, renal failure, Cron's disease, rheumatic diseases etc.), malignant tumors, using of medications likely to influence BMD (except bisphosphonates, calcium and vitamin D supplementation). After assessing compliance with inclusion and exclusion criteria all the enrolled women signed written informed consent for participation in the study in accordance with the declaration of Helsinki (as revised in 2013). Participants of the study have filled out questionnaires to identify risk factors for OP (age of menopause, history of fractures etc.).

BMD was evaluated by DEXA (GE Lunar, Madison, WI, USA). Calibration of the devise was performed daily using a standard spine phantom provided by the manufacturer. Lumbar spine (LS, L1–L4) and femoral neck (FN) BMD (g/cm^2) was measured on the same machine. Diagnosis of OP was established on the basis of T-criteria for Caucasian women [17].

Determination of serum total vitamin D (25(OH)D) concentration was performed by electrochemiluminescence immunoassay on the Cobas e411 analyzer (Roche Diagnostic), fasting blood samples were obtained from the cubital vein in the morning, not earlier than 10–12 hours after the last meal, into a sterile vacuum Vacutainer tube without additives. In accordance with international recommendations, level of vitamin D was considered appropriate at 25(OH)D value > 30 ng/ml, deficiency was diagnosed at rates of 20–30 ng/ml, 25(OH)D concentration less than 20 ng/ml was considered as vitamin D deficiency [18–20].

For genetic analysis, venous blood samples were taken from the cubital vein using the Vacutainer system with EDTA (Beckton-Dickinson, USA). DNA was isolated using the standard phenol-chloroform extraction. The quantity of DNA samples was checked using Qubit 2 Fluorimeter (Thermo Scientific, USA), the quality and purity were checked using NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Information on *VDR* gene variants was obtained from Entrez Gene database (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene). SNVs were selected according to the following criteria: minor allele frequency (MAF) higher than 5 %; and reported associations with BMD or BMD-related risk factors in previous studies. Selected variants (ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, TaqI rs731236, FokI rs2228570 and Cdx2 rs11568820) were determined using the quantitative polymerase chain reaction (PCR) with TaqMan Probes (Thermo Fisher Scientific, USA) in the CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad©, USA) as previously described [21, 22]. The whole reacting volume in PCR tubes was 10 μL, including 5 μL iTaq™ Universal Probes Supermix BioRad©, 3.75 μL of mQ water, 0.25 μL×40 TaqMan™ SNP Genotyping Assay, 1 μL of genomic DNA (15 ng). The reactions were performed with an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing and synthesis at 60 °C for 30 s. The final extension was performed at 72 °C for 1 min. The genotypes were analyzed on the basis of the melting curve Negative and positive

controls were randomly included across each PCR run, several samples were randomly re-genotyped for quality control purposes.

Statistical analysis was performed using the programming language R. The data was presented as median (25 %, 75 % interquartile range) and compared using Mann–Whitney *U*-test. The deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by the chi-square (χ^2) test. The genetic risk of OP was estimated using odds ratios, with 95 % confidence intervals (CI) and calculated in comparison to reference (major homozygous) genotype. Codominant model was defined and tested for all SNVs. Logistic regression models were used to assess difference between the characteristics of analyzed groups for categorical data and for comparison of genotype frequencies between these groups. Multivariate Linear Regression model was used to adjust for confounding factors, such as age at menopause, weight, height, BMI, BMD, and for analysis of genotypes association with quantitative traits. Beta (β) measures difference in quantitative trait between genotypes. Pairwise linkage disequilibrium (LD) and haplotype analysis were performed using the R-packages "haplo.stats" (v.1.7.9) and "SNPassoc" (v.1.9-2), the programs used likelihood ratio tests in a generalized linear model and the expectation-maximization algorithm. The efficacy of designed model for predicting risk of disease was analyzed using multivariate logistic regression with the construction of ROC-curve (Receiver Operating Characteristics) using R-package "pROC" (v.1.16.2). The differences between the groups were considered statistically significant at $p < 0.05$. *p*-values corrected for multiple testing using the False Discovery Rate (FDR) with Benjamini and Hochberg procedure ($n = 5$, multiple comparisons).

Results and discussion. Genomic DNA was extracted from blood samples of 350 patients with PMO and 243 individuals from control group. The participants within both groups were matched for age and sex – no statistically significant differences were found (Tab. 1).

T a b l e 1. **Clinical characteristics of study subjects**

Clinical characteristic	Patients with PMO	Control	*p*-value
Number (%)	350 (59.1)	243 (40.9)	–
Age, years	62.8 (57.1; 69.4)	62.2 (58.2; 68.0)	0.61
Age at menopause, years	48.9 (47.0; 52.0)	50.3 (48.0; 53.0)	0.03
Weight, kg	66.4 (57.8; 74.0)	80.8 (72.0; 91.0)	<0.0001
Height, cm	160.2 (155.0; 165.0)	161.5 (157.0; 166.0)	0.04
BMI	25.9 (22.5; 28.8)	31.1 (28.0; 34.5)	<0.0001
Baseline LS BMD, g/cm^2	0.87 (0.79; 0.94)	1.28 (0.17; 1.35)	<0.0001
Baseline LS T-score	–2.5 (–3.2; –2.0)	0.7 (–0.2; 1.1)	<0.0001
Baseline LS Z-score	–1.1 (–1.7; –0.5)	1.38 (0.5; 2.1)	<0.0001
Baseline FN BMD, g/cm^2	0.79 (0.72; 0.87)	1.1 (0.99; 1.12)	<0.0001
Baseline FN T-score	–1.7 (–2.4; –1.1)	0.6 (–0.1; 1.0)	<0.0001
Baseline FN Z-score	–0.7 (–1.2; –0.1)	1.1 (0.5; 1.7)	<0.0001
Fractures in history	46 (13.1 %)	5 (2.1 %)	<0.0001
β-CrossLaps (β-CTx), ng/ml	2.6 (0.3; 0.5)	0.9 (0.2; 0.5)	0.009
Osteocalcin (BGLAP), ng/ml	26.0 (16.3; 28.8)	30.4 (19.3; 34.1)	0.46
Parathyroid hormone (PTH), pg/ml	54.5 (33.6; 69.0)	48.3 (32.9; 56.2)	0.63
25-hydroxyvitamin D (25(OH)D), ng/ml	29.8 (20.7; 36.8)	20.5 (15.4; 25.2)	$2.3 \cdot 10^{-7}$

N o t e. The data is presented as mean (25 %; 75 % interquartile range). LS, lumbar spine, FN, femoral neck, BMD, bone mineral density, BMI, bone mass index.

The comparison of PMO group with control group using Mann–Whitney *U*-test revealed a slightly significant difference in age at menopause ($p = 0.03$) and height ($p = 0.04$). A strong difference between groups was revealed for weight, BMI, lumbar spine and femoral neck BMD, T- and Z-scores. These factors were considered to potential confounding factors and were adjusted in association analysis. In the study cohort, 46 patients had a fracture history (at least one), compared to 5 individuals from control group. There was no statistically significant difference in osteocalcin and parathormone levels between analyzed groups. However, we did find differences in β-CTx and 25(OH)D levels (Tab. 1).

Five the most commonly analysed polymorphic loci of *VDR* gene were selected from key publications and studied as candidate markers of PMO. These SNVs with previously established involvement in vitamin D and bone tissue metabolisms were included to the study to validate their effect by analysis of combinations of genetic variants on independent cohort. A detailed description of the *VDR* gene variants and their frequencies in control population is presented in Tab. 2.

T a b l e 2. **SNV information of VDR gene in control population**

SNV	Placements GRCh38.p12	Minor allele	MAF	GnomAD MAF	Heterozygosity		HWE *p*-value
					observed	predicted	
rs7975232	g.47845054 C>A	C	0.45	0.47	0.47	0.49	0.44
rs1544410	g.47846052 C>T	T	0.41	0.38	0.44	0.48	0.23
rs731236	g.47844974 A>G	G	0.40	0.38	0.44	0.48	0.14
rs2228570	g.47879112 A>G	A	0.42	0.37	0.51	0.49	1
rs11568820	g.47908762 C>T	T	0.19	0.18	0.29	0.31	0.5

N o t e. MAF – minor allele frequency, HWE – Hardy-Weinberg equilibrium.

The genotype frequencies of all analyzed SNVs were not significantly different from Hardy-Weinberg equilibrium at 5 % level in control group (Tab. 2) and in PMO patients ($p > 0.05$). MAF in control group was calculated and were not significantly different from those taken from to GnomAD data (gnomad.broadinstitute.org) and were close to those of Caucasian subjects reported meta-analysis [7].

All patients were genotyped in the study. The distribution of genotype frequencies of *VDR* gene variants together with the *p*-values are shown in Tab. 3.

T a b l e 3. **The distribution of genotype frequencies of VDR gene variants in patients with postmenopausal osteoporosis (PMO) and control (CON) groups**

Gene variant	Genotype	PMO, %	CON, %	OR (95 % CI)	*p*-value	
					Raw*	FDR**
VDR ApaI rs7975232	C/C	23.8	31.3	1	**0.027**	**0.045**
	C/A	45.1	46.9	1.3 (0.8–1.9)		
	A/A	31.1	21.8	**1.9 (1.2–3.0)**		
VDR BsmI rs1544410	C/C	23.3	37.0	1	**0.006**	**0.015**
	C/T	46.6	44.4	**1.7 (1.1–2.5)**		
	T/T	30.1	18.5	**2.6 (1.6–4.2)**		
VDR TaqI rs731236	A/A	24.4	37.9	1	**0.001**	**0.005**
	A/G	47.8	46.6	**1.7 (1.2–2.5)**		
	G/G	27.9	18.5	**2.3 (1.5–3.7)**		
VDR FokI rs2228570	G/G	26.6	32.3	1	0.45	0.45
	A/G	49.7	50.8	4.5 (2.4–8.7)		
	A/A	23.7	16.9	29.3 (3.6–241.0)		
VDR Cdx2 rs11568820***	C/C	70.7	66.2	1	0.3	0.375
	C/T + T/T	29.3	33.8	0.8 (0.6–1.2)		

N o t e. * – raw *p*-values; ** – *p*-values corrected for multiple testing using the False Discovery Rate ($n = 5$); *** – dominant model of inheritance used due to low minor allele frequency. OR – odds ratio, CI – confidence interval.

The most frequent homozygous genotype was taken for reference. Comparing the genotype frequencies between PMO and CON groups, statistically significant differences after FDR correction for multiple testing were observed for ApaI rs7975232, BsmI rs1544410 and TaqI rs731236 variants of *VDR* gene. The BsmI T/T genotype was significantly over-represented in PMO patients (30.1 %) compared to control

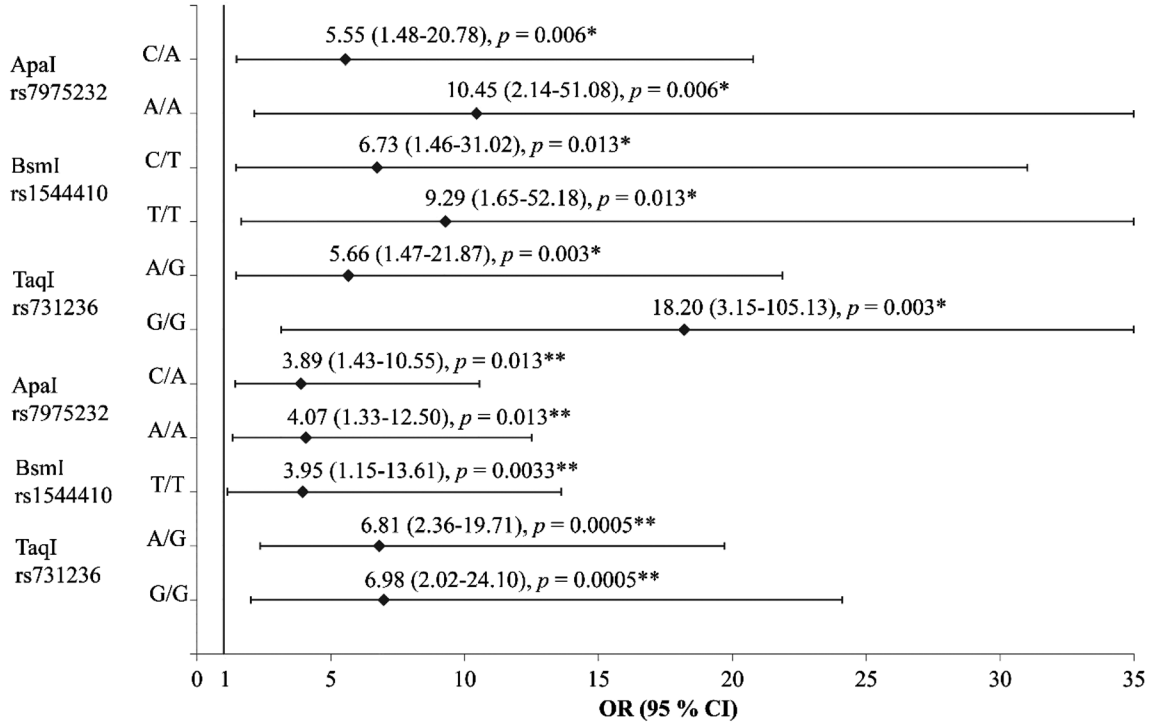


Fig. 1. Significant distribution of specified genotypes of ApaI, BsmI and TaqI variants of *VDR* gene between women with PMO and control group, adjusted by age at menopause, height, weight and (*) LS or (**) FN BMD. *p*-values corrected for multiple testing using the FDR (n = 5, multiple comparisons)

group (18.5 %, OR = 2.6, 95 % CI 1.6–4.2, p_{FDR} = 0.015). For the bearers of TaqI rs731236 G/G homozygous genotype, the risk of osteoporosis was increased (OR = 2.3, 95 % CI 1.5–3.7, p_{FDR} = 0.005). Increased risk of PMO was also revealed for the bearers of heterozygous genotypes of *VDR* BsmI and TaqI variants. The PMO group individuals were more likely to carry *VDR* ApaI A/A genotype (31.1 %), compared to the CON group (21.8 %, OR = 1.9, 95 % CI 1.2–3.0, p_{FDR} = 0.045).

As mentioned above, between the study groups there were significant differences in some clinical characteristics revealed, including age at menopause, height, weight, BMI, LS and FN BMD and others (Tab. 1). To reduce the potential impact of these confounding factors on the results of the analysis, we performed logistic analysis using codominant model of inheritance, adjusted by age at menopause, height, weight, LS and FN BMD. Revealed significant association for adjusted analysis is presented in a forest plot (Fig. 1).

When adjusted by confounding factors, the risk of PMO became much higher for the bearers of ApaI A/A (OR = 10.5, 95 % CI 2.1–51.1, p_{FDR} = 0.006), BsmI T/T (OR = 9.3, 95 % CI 1.7–52.2, p_{FDR} = 0.013) and TaqI G/G (OR = 18.2, 95 % CI 3.2–105.1, p_{FDR} = 0.003) genotypes. In addition, increased risk for PMO was also revealed for the bearers of heterozygous ApaI C/A genotype, which was absent in non-adjusted analysis.

There was no any statistically significant difference revealed in distribution of *VDR* FokI rs2228570 and Cdx2 rs11568820 variants between PMO and CON groups. Since Cdx2 rs11568820 T-allele frequency was very low, we used dominant model of inheritance and merged C/T+T/T genotypes. Despite the absence of significant association, it can be noted that the frequency of Cdx2 AA-genotype is significantly higher in the CON group (4.4 %) compared to PMO patients (1.1 %).

The sample size calculation for separately analyzed genotype frequencies was performed for a significance level of 5 %, post-hoc power value, calculated for *VDR* ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, TaqI rs731236, FokI rs2228570 and Cdx2 rs11568820, were 75.2, 82.3, 82.4, 58.3, 24.6 %, respectively.

In a further work, the pairwise linkage disequilibrium between the SNVs within *VDR* gene was estimated in terms of D' and r^2. LD plot was constructed using combined genotype data from both groups of individuals (Fig. 2).

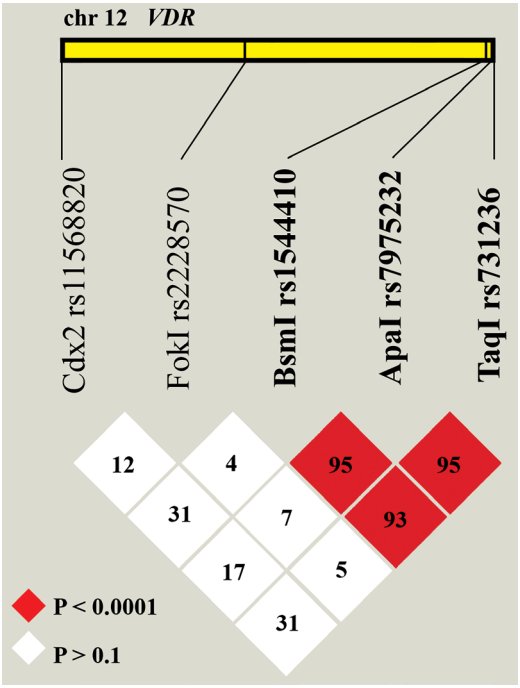


Fig. 2. Linkage disequilibrium plot for ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, TaqI rs731236, FokI rs2228570 and Cdx2 rs11568820 of *VDR* gene. LD is displayed as pairwise D' values multiplied by 100 and given for each SNV combination within each cell. Red cells correspond to a very strong LD; ApaI, BsmI and TaqI variants are in the same LD block

By the LD analysis, we identified one haplotype block, composed of ApaI, BsmI and TaqI variants (the measure D' was very close to 1, $p << 0.01$). The positive coefficient of correlation r^2 suggests that major alleles of *VDR* ApaI, BsmI and TaqI gene variants are likely to be inherited together, as well as minor alleles. No significant LD was found for Cdx2 and FokI variants. For further analysis, based on LD data, we combined three *VDR* gene variants ApaI, BsmI, TaqI and performed the haplotype analysis (Tab. 4). FokI and Cdx2 variants were removed from further analysis due to the absence of significant association. Haplotypes were constructed from all possible allelic combinations of three *VDR* markers and compared between the PMO and CON groups, adjusted by age at menopause, weight, height and LS BMD.

Six haplotypes (C-C-A, A-T-G, A-T-A, C-C-G, A-C-A, A-C-G) of the possible eight combinations were inferred at a frequency greater than 1 %. They were present in 97.7 % of study participants. Statistically significant differences between analyzed groups were revealed in the global distribution of allelic combinations (global *p*-value <0.0001), suggesting an association of analyzed haplotypes with the risk of PMO. Statistically significant difference was revealed in distribution of most frequent C-C-A and A-T-G haplotypes between the PMO and control groups even after FDR correction for multiple testing (Tab. 4). The C-C-A haplotype, constructed from three wild-type alleles, was the most frequent (total frequency 40.7 %). This haplotype frequency was significantly higher among controls (46.8 %) than among cases (36.0 %, $p_{FDR} = 0.049$). The negative haplotype score value of –3.39 suggested that this combination is associated with decreased risk of PMO. The total frequency of A-T-G haplotype was 36.6 %, it was significantly under-represented in CON group (31.7 %) compared to PMO group (40.0 %, $p_{FDR} = 0.008$), suggesting that this allelic combination might confers a greater susceptibility to OP. Compared to the most frequent reference (wild-type) haplotype C-C-A, for the bearers of A-T-G haplotype, the risk of PMO was significantly increased (OR = 4.6, 95 % CI 1.7–12.5, $p = 0.003$, haplotype score 3.06). No significant association was found for other revealed haplotypes. A similar picture was observed for FN BMD association with haplotypes (the data is not presented).

Table 4. **Haplotype analysis of VDR gene ApaI, BsmI and TaqI variants in patients with postmenopausal osteoporosis (PMO) and control (CON) groups, adjusted by age at menopause, weight, height and LS BMD**

Haplo-type	Frequency		*p*-value		Haplotype score	Logistic regression		Global score test
	PMO	CON	Raw	FDR		OR (95 % CI)	*p*-value	
C-C-A	36.0	46.8	**0.0007**	**0.049**	–3.39	1	–	Global-stat = 18.75, df = 7, $p = 0.009$
A-T-G	40.0	31.7	**0.0022**	**0.008**	3.06	**4.6 (1.7–12.5)**	**0.003**	
A-T-A	10.5	8.2	0.42	0.74	0.81	1.9 (0.4–9.2)	0.44	
C-C-G	7.1	9.1	0.89	0.89	1.06	1.8 (0.1–25.6)	0.68	
A-C-A	3.8	1.9	0.67	0.78	–1.47	1.9 (0.1–76.9)	0.75	
A-C-G	1.6	1.2	0.55	0.77	–0.59	0.4 (0.1–5.8)	0.49	
rare	1.0	1.1	0.14	0.33	–0.43	2.81 (0.8–9.7)	0.54	

A haplotype is an allelic combination of several gene variants, that are in a strong LD and inherited together. Haplotypes distribution analysis is very important for investigating the genetic aspects of multifactorial diseases, when the power of separate gene analysis is very weak due to correction for multiple testing. Thus, determination of association between genetic polymorphism and phenotype based on haplotype

score seems more critical compared to genotypes and alleles analysis, as it helps to reduce the impact of type I errors (false positive).

Previous studies on Caucasian women with PMO reported that ApaI-BsmI-TaqI A-T-G haplotype was significantly associated with similarly increased risk of OP (OR = 4.2, 95 % CI 2.2–8.1, $p < 0.001$) [23]. Very close haplotype frequency distribution was reported for Dutch [9] and Italian [14] women. However, relatively few studies have been reported to date with significant association of *VDR* gene haplotypes association with PMO risk in Caucasian women.

The analysis of genotype and haplotype distribution between patients with PMO and control group allowed us to identify several informative markers within *VDR* gene, associated with the risk of pathology. A huge interest presents analysis of association of *VDR* gene variants with the level of BMD in lumbar spine and femoral neck, as fractures of this regions are the main clinical manifestation of osteoporosis. The association analysis of quantitative data is usually more objective, will complement qualitative studies and possibly provide with new informative genetic markers. The association analysis between ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, TaqI rs731236, FokI rs2228570 and Cdx2 rs11568820 variants of *VDR* gene and BMD level was performed using linear regression on the combined PMO and control groups (Fig. 3).

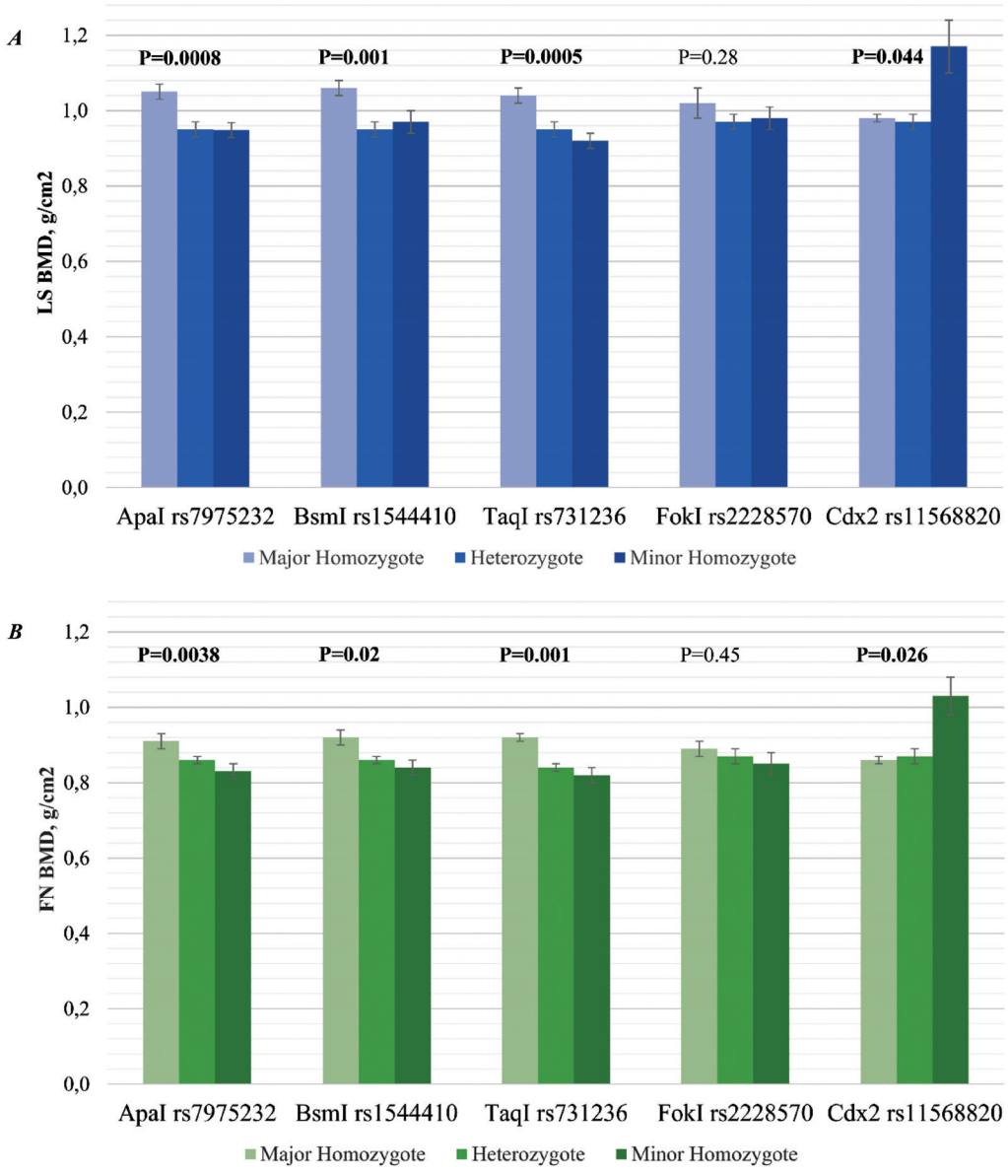


Fig. 3. Bone mineral density measured in lumbar spine (LS, *A*) and femoral neck (FN, *B*) in relation to *VDR* gene variants. *p*-values corrected for multiple testing using the FDR ($n = 5$, multiple comparisons)

Linear regression analysis indicated that different genotypes of four *VDR* gene variants are significantly associated with LS and FN BMD level (Fig. 3). The most significant association with BMD was revealed for TaqI 731236 variant (p_{FDR} = 0.0005 for LS and p_{FDR} = 0.001 for FN). Interestingly, for TaqI marker, there is a gene/dose response: the highest level of LS and FN BMD was found for the bearers of homozygous wild-type genotype A/A (1.04 ± 0.02 and 0.92 ± 0,01 g/cm^2, respectively), intermediate BMD was found in heterozygotes (0.95 ± 0.02 and 0.84 ± 0.01 g/cm^2), and the lowest BMD was found in homozygous for the minor alleles G/G genotype (0.92 ± 0.02 and 0.82 ± 0.02 g/cm^2). ApaI rs7975232 and BsmI rs1544410 variants were also associated with both LS and FN BMD, with highest BMD level in wild-type homozygotes and lowest – in minor homozygotes (ApaI C/C 1.05 ± 0.02 *vs.* A/A 0.95 ± 0.02 g/cm^2, BsmI C/C 1.06 ± 0.02 *vs.* 0.97 ± 0.03 g/cm^2 (Fig. 3, *A*); ApaI C/C 0.91 ± 0.02 *vs.* A/A 0.83 ± 0.02 g/cm^2, BsmI C/C 0.92 ± 0.02 *vs.* 0.84 ± 0.02 g/cm^2 (Fig. 3, *B*).

Interestingly, in quantitative analysis of Cdx2 rs11568820 variant association with LS and FN BMD, a statistically significant association was revealed. Substitution of C to T was associated with much higher LS BMD level (β = 0.19, 95 % CI 0.04–0.33, p_{FDR} = 0.044 (Fig. 3, *A*), as well as higher FN BMD (β = 0.18, 95 % CI 0.05–0.3, p_{FDR} = 0.026 (Fig. 3, *B*). This means that the substitution (T-allele) of Cdx2 rs11568820 has a protective effect (the only one from 5 markers, included in analysis). In previous comparison of PMO patients and control group, no statistically significant association was found in genotypes distribution (Tab. 3). As for group analysis, no significant association for FokI rs2228570 was found for both LS and FN BMD.

Since the first report, showing an association of *VDR* gene with BMD [24], several studies have been performed to investigate the relationship of various *VDR* variants with BMD in various populations. The widespread interest in the *VDR* gene may be explained by its main function to maintain the balance of serum calcium and phosphates in the human body. In general, obtained results are comparable with the results of other studies conducted on the European population [7]. However, in some studies, inconsistent results were observed. In a study on Polish population, authors observed dose effect of a single *VDR* FokI variant on the LS BMD, which was not found in present study [10]. Such inconsistency, observed in different populations, can be largely explained environmental factors and ethnicity, suggesting the importance of research on various nations.

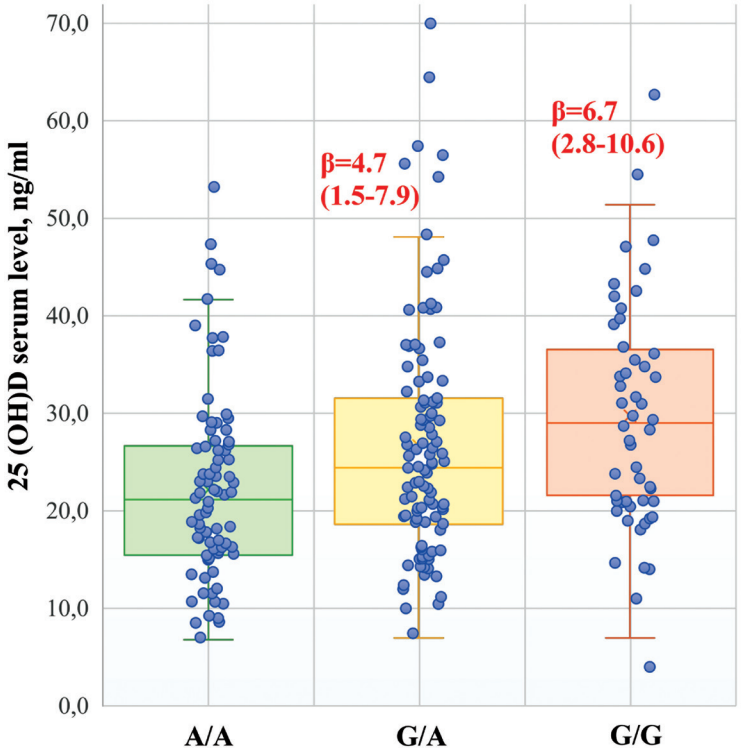


Fig. 4. Serum level of 25-hydroxyvitamin D in bearers of different *VDR* TaqI genotypes (p_{FDR} = 0.008). β – difference in 25(OH)D levels between reference (G/G) and corresponding genotype, error bars represent 25 % and 75 % quartiles

Of particular interest is the correlation analysis of the serum level of 25-hydroxyvitamin D with *VDR* gene variants. This analysis was performed to explore weather *VDR* variants has any influence on circulating 25(OH)D level. Multiple regression analysis indicated revealed association of 25(OH)D serum level with *VDR* TaqI 731236 genotypes (Fig. 4), but not with ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, FokI rs2228570 and Cdx2 rs11568820.

The genetic effects of *VDR* TaqI on serum 25(OH)D were gene-dose dependent (Fig. 4): the lowest level was found in reference homozygotes (22.34 ± 1.07 ng/ml), intermediate – in heterozygotes (27.04 ± 1.19 ng/ml) and the highest – in bearers of homozygous G/G genotypes (29.05 ± 1.63 ng/ml, p_{FDR} = 0.008). A tendency for a gene-dose response was found between circulating 25(OH)D and *VDR* BsmI rs1544410 (C/C 23.58 ± 1.18 ng/ml, C/T 26.69 ± 1.23 ng/ml, T/T 27.78 ± 1.59 ng/ml, β = 4.21, 95 % CI 0.3–8.1, p_{FDR} = 0.088) and Cdx2 rs11568820 (C/C 26.85 ± 0.92 ng/ml, C/T 23.15 ± 1.38 ng/ml, T/T 19.43 ± 2.34 ng/ml, β = –3.70, 95 % CI –7.08…–0.32, p_{FDR} = 0.07). No association with 25(OH)D level for ApaI rs7975232 and FokI rs2228570 was found. In order to increase the statistical power, we analyzed association of serum 25(OH)D level with *VDR* ApaI, BsmI, TaqI and Cdx2 haplotypes (Tab. 5).

T a b l e 5. **Haplotype analysis of VDR gene ApaI, BsmI, TaqI and Cdx2 variants association with serum 25(OH)D level**

Haplotype	Frequency	25(OH)D, ng/ml (mean ± SE)	Linear regression	
			β (95 % CI)	p_{FDR}
C-C-A-C	39.4	23.38 ± 1.49	0	–
A-T-G-C	27.3	27.51 ± 1.27	**4.1 (1.6–6.5)**	**0.007**
C-C-G-C	7.3	29.22 ± 2.50	**6.3 (1.7–10.8)**	**0.02**
A-T-G-T	6.9	20.76 ± 2.21	–2.5 (–6.8…–1.8)	0.3
A-T-A-C	6.8	23.66 ± 2.57	0.0 (–4.7…– 4.7)	1
C-C-A-T	6.5	20.33 ± 2.55	–3.9 (–8.0…–1.9)	0.33
Rare	5.8	27.07 ± 5.65	5.1 (0.3–9.9)	0.07
Global haplotype association *p*-value 0.037				

Statistically significant differences were revealed in the global haplotypes distribution (global *p*-value = 0.037), suggesting an association of analyzed haplotypes with 25(OH)D. Interestingly, the highest level of serum 25-hydroxyvitamin D was found in bearers of non-favorable alleles of *VDR* gene variants (A-T-G-C), which reduce vitamin D receptor expression, suggesting that *VDR* gene variants are crucial for circulating 25(OH)D level. For the bearers of A-T-G-C haplotype, 25(OH)D level was significantly higher compared to reference haplotype (β = 4.1, 95 % CI 1.6–6.5, p_{FDR} = 0.007). The increased level of circulating 25(OH)D level may be explained by the fact that most patients with osteoporosis performed vitamin D supplementation, and in patients bearing unfavorable genotypes this vitamin was metabolized less efficiently. This hypothesis is confirmed by the fact that the level of *VDR* mRNA was remarkably reduced in bearers of BsmI T/T-genotype compared to individuals with C/C genotype [25]. Located at 3′-end of the *VDR* gene, ApaI, BsmI and TaqI variants are associated with the different length poly-adenylate sequence and affect the stability of mRNA, while Cdx2 variant could change the transcription activity of the promoter region of the gene [26]. The FokI variant, located in second exon, forms second methionine start site, producing a shorter protein receptor, which displayed higher transcriptional activity. 25(OH)D concentration was higher in bearers of the G/G-genotype compared to individuals with A/A-genotype [27]. Thus, differential activity of the receptor could alter the pattern of vitamin D-mediated gene activation, and thus impact on a wide range of enzymes involved in the production and elimination of 25(OH)D.

The association of serum 25(OH)D with *VDR* variants, revealed in present study, corresponds to previous research on vitamin D supplementation depending on *VDR* genotype [28], where various degrees of metabolic improvements from vitamin D supplementation were observed due to *VDR* gene variation, but the concentration of the active ligand 1.25(OH)D may be suboptimal. In the bearers of non-favorable homozygous ApaI A/A, BsmI T/T, TaqI G/G, FokI A/A genotypes, the baseline 25(OH)D level was higher compared to reference (wild-type) homozygous genotypes. This tendency remained

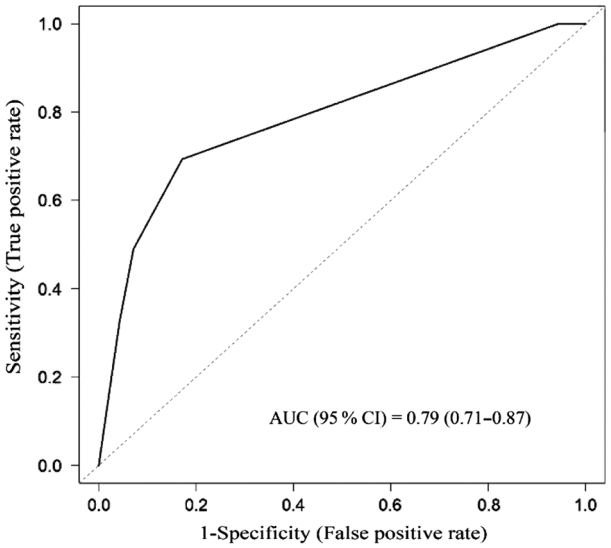


Fig. 5. Area under the receiver operating characteristic curve for a model of PMO risk evaluation

and the difference even increased after vitamin D intervention of 2000IU per day for 12 months (except for *VDR* FokI variant) [28]. Our data is consistent also with other prior reports [29], when higher circulating 25(OH)D was found in volunteers, carrying minor allele at a *VDR* BsmI rs1544410, previously associated with reduced fracture risk. It was hypothesized that the presence of ApaI C-, BsmI C-, TaqI A- and Cdx2 C-alleles of *VDR* gene provides higher expression level of vitamin D receptor, resulting in a better 25(OH)D hydroxylation following vitamin D supplementation. The current study adds the strength to the previous research on association of *VDR* gene functional variants with serum 25(OH)D level.

Thus, according to the performed analysis of the distribution of *VDR* gene variants in patients with PMO and control group, as well as their association with clinical parameters, we have identified four informative genetic markers. The integration of previously identified associations in the combined cohort of both patients and controls allowed to increase the statistical power of the study, as well as to identify a number of new associations, providing with new knowledge for understanding the molecular pathogenesis of osteoporosis and vitamin D metabolism. But it is well known that simple measure of OR association is not essential to reveal prognostic value of genetic variant [30]. To determine the diagnostic and prognostic value of the developed complex clinical and genetic model for evaluation of individual osteoporosis risk, we performed analysis of ROC-curve with area under the curve (AUC) calculation. The AUC in interval of 0.6–0.7 indicate average, 0.7–0.8 – good, and 0.8–0.9 – very good diagnostic level. The ROC analysis will help to separate individuals with high risk of PMO from those with low risk. The results of the ROC-analysis performed for *VDR* ApaI rs7975232, BsmI rs1544410, TaqI rs731236, FokI rs2228570 and Cdx2 rs11568820 variants is presented in Fig. 5.

The model of osteoporosis risk prediction possesses a good prognostic value, AUC = 0.79 (95 % CI 0.71–0.87 (Fig. 5). The model was characterized by high sensitivity level (82.9 %), with average specificity (69.4 %) and good accuracy (77.3 %). Thus, PMO risk assessment model, constructed only from genetic predictors, has shown good predictive value. Nevertheless, in present study we were unable to analyze different genetic markers, associated with bone turnover. The inclusion of other genetic markers, as well as clinical, biochemical, anthropometric, demographic, behavioral factors in this model will significantly increase its prognostic value.

As vitamin D status is linked not only to osteoporosis, but also to many other conditions, understanding the genetic variants that are responsible for vitamin variation is vital and may help us to better understand complex relationship between genetic and environmental factors in multifactorial pathology.

Conclusion. The major finding of this study was the development of model for evaluation of osteoporosis risk, constructed from informative genetic markers of *VDR* gene, which may have a prognostic importance. Our results suggest that the *VDR* ApaI rs7975232, BsmI rs1544410 and TaqI rs731236 variants and their haplotypes are associated with PMO risk in Belarusian women. Together with Cdx2 rs11568820, these markers are associated with BMD variation, and their haplotypes – with serum 25(OH)D level. We consider that revealed informative genetic markers have important clinical significance and our study makes significant contribution to the establishment of the molecular pathogenesis of postmenopausal osteoporosis.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgements. This study was funded by a grant 6.3 of the Union State Program "DNA Identification". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Christakos S., Dhawan P., Verstuyf A., Verlinden L., Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological Reviews*, 2016, vol. 96, no. 1, pp. 365–408. https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015

2. Pludowski P., Holick M. F., Pilz S., Wagner C. L., Hollis B. W., Grant W. B. [et al.]. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality – a review of recent evidence. *Autoimmunity Reviews*, 2013, vol. 12, no. 10, pp. 976–989. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.02.004

3. Miyamoto K., 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/mend.11.8.9951

4. Yamamoto H., Miyamoto K., Li B., Taketani Y., Kitano M., Inoue Y., Morita K., Pike J. W., Takeda E. 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. 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

7. Zhang L., Yin X., Wang J., Xu D., Wang Y., Yang J., Tao Y., Zhang S., Feng X., Yan C. 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

8. 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. https://doi.org/10.1023/a:1010062929140

9. Uitterlinden A. G., Weel A. E., Burger H., Fang Y., van Duijn C. M., Hofman A., van Leeuwen J. P., Pols H. A. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type Ialpha1 gene in susceptibility for fracture. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, vol. 16, no. 2, pp. 379–385. https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.2.379

10. Horst-Sikorska W., Kalak R., Wawrzyniak A., Marcinkowska M., Celczynska-Bajew L., Slomski R. Association analysis of the polymorphisms of the *VDR* gene with bone mineral density and the occurrence of fractures. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2007, vol. 25, no. 5, pp. 310–319. doi:10.1007/s00774-007-0769-5

11. Zintzaras E., Rodopoulou P., Koukoulis G. N. BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (*VDR*) gene and the risk of osteoporosis: a meta-analysis. *Disease Markers*, 2006, vol. 22, no. 5–6, pp. 317–326. https://doi.org/10.1155/2006/921694

12. 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.

13. Pedrera-Canal M., Moran J. M., Vera V., Roncero-Martin R., Lavado-Garcia J. M., Aliaga I., Pedrera-Zamorano J. D. Lack of influence of vitamin D receptor BsmI (rs1544410) polymorphism on the rate of bone loss in a cohort of postmenopausal spanish women affected by osteoporosis and followed for five years. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 9, p. e0138606. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138606

14. Colombini A., Brayda-Bruno M., Lombardi G., Croiset S. J., Ceriani C., Buligan C., Barbina M., Banfi G., Cauci S. BsmI, ApaI and TaqI Polymorphisms in the vitamin D receptor gene (*VDR*) and association with lumbar spine pathologies: an Italian case-control study. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 5, p. e0155004. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155004

15. Zhao B., Zhang W., Du S., Zhou Z. Vitamin D receptor BsmI polymorphism and osteoporosis risk in post-menopausal women. *Archives of Medical Science*, 2016, vol. 12, no. 1, pp. 25–30. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.57475

16. Marozik P., Alekna V., Rudenko E., Tamulaitiene M., Rudenka A., Mastaviciute A., Samokhovec V., Cernovas A., Kobets K., Mosse I. Bone metabolism genes variation and response to bisphosphonate treatment in women with postmenopausal osteoporosis. *PLoS ONE*, 2019, vol. 14, no. 8, p. e0221511. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221511

17. Cosman F., de Beur S. J., LeBoff M. S., Lewiecki E. M., Tanner B., Randall S., Lindsay R.; National osteoporosis foundation. clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis International*, 2014, vol. 25, no. 10, pp. 2359–2381. https://doi.org/10.1007/s00198-014-2794-2

18. Holick M. F., Binkley N. C., Bischoff-Ferrari H. A., Gordon C. M., Hanley D. A., Heaney R. P., Murad M. H., Weaver C. M. Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2011, vol. 96, no. 7, pp. 1911–1930. https://doi.org/10.1210/jc.2011-0385

19. Sempos C. T., Heijboer A. C., Bikle D. D., Bollerslev J., Bouillon R., Brannon P. M. [et al.]. Vitamin D assays and the definition of hypovitaminosis D: results from the First International conference on controversies in vitamin D. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, vol. 84, no. 10, pp. 2194–2207. https://doi.org/10.1111/bcp.13652

20. Pilz S., Zittermann A., Trummer C., Theiler-Schwetz V., Lerchbaum E., Keppel M. H., Grübler M. R., März W., Pandis M. Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. *Endocrine Connections*, 2019, vol. 8, no. 2, pp. R27–R43. https://doi.org/10.1530/EC-18-0432

21. Marozik P. M., Tamulaitiene M., Rudenka E., Alekna V., Mosse I., Rudenka A., Samokhovec V., Kobets K. Association of Vitamin D receptor gene variation with osteoporosis risk in belarusian and lithuanian postmenopausal women. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2018, vol. 9, p. 305. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00305

22. Rudenko E. V., Rudenko E. V., Samokhovets O. Yu., Kobets E. V., Morozik 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 = Proceeding 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

23. Thakkinstian A., D'Este C., Attia J. Haplotype analysis of *VDR* gene polymorphisms: a meta-analysis. *Osteoporosis International*, 2004, vol. 15, no. 9, pp. 729–734. https://doi.org/10.1007/s00198-004-1601-x

24. Morrison N. A., Qi J. C., Tokita A., Kelly P. J., Crofts L., Nguyen T. V., Sambrook P. N., Eisman J. A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994, vol. 367, no. 6460, pp. 284–287. https://doi.org/10.1038/367284a0

25. Luo X. Y., Yang M. H., Wu F. X., Wu L. J., Chen L., Tang Z., Liu N. T., Zeng X. F., Guan J. L., Yuan G. H. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. *Lupus*, 2012, vol. 21, no. 1, pp. 53–59. https://doi.org/10.1177/0961203311422709

26. Fang Y., van Meurs J. B., d'Alesio A., Jhamai M., Zhao H., Rivadeneira F. [et al.]. Promoter and 3-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the Rotterdam study. *American Journal of Human Genetics*, 2005, vol. 77, no. 5, pp. 807–823. https://doi.org/10.1086/497438

27. Monticielo O. A., Brenol J. C., Chies J. A., Longo M. G., Rucatti G. G., Scalco R., Xavier R. M. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2012, vol. 21, no. 1, pp. 43–52. https://doi.org/10.1177/0961203311421798

28. Al-Daghri N. M., Mohammed A. K., Al-Attas O. S., Ansari M. G. A., Wani K., Hussain S. D., Sabico S., Tripathi G., Alokail M. S. Vitamin D receptor gene polymorphisms modify cardiometabolic response to vitamin D supplementation in T2DM patients. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, no. 1, p. 8280. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08621-7

29. Gaffney-Stomberg E., Lutz L. J., Shcherbina A., Ricke D. O., Petrovick M., Cropper T. L., Cable S. J., McClung J. P. Association between single gene polymorphisms and bone biomarkers and response to calcium and vitamin D supplementation in young adults undergoing military training. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2017, vol. 32, no. 3, pp. 498–507. https://doi.org/10.1002/jbmr.3008

30. Pepe M. S., Janes H., Longton G., Leisenring W., Newcomb P. Limitations of the odds ratio in gauging the performance of a diagnostic, prognostic, or screening marker. *American Journal of Epidemiology*, 2004, vol. 159, no. 9, pp. 882–890. https://doi.org/10.1093/aje/kwh101

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: alenka.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

Самоховец Ольга Юрьевна – канд. мед. наук, врач. Минский городской центр остеопороза и болезней костно-мышечной системы (пр. Независимости, 64, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). Минск, Республика Беларусь. E-mail: samokhovec.olga@gmail.com

Кобец Екатерина Вячеславовна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Kobets@igc.by

Морозик Павел Михайлович – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 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: alenka.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

Volha Yu. Samokhovec – Ph. D. (Med.), Doctor. City Center for Osteoporosis and Bone-Muscular Diseases Prevention. (64, Nezavisimosti Ave., 22013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: samokhovec.olga@gmail.com

Katsiaryna V. Kobets – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Kobets@igc.by

Pavel M. Marozik – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. 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

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 618.36-008-06:616.61-036.12:616.391:577.161.2
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-493-499

Поступила в редакцию 03.09.2019
Received 03.09.2019

Г. С. Манасова, Н. В. Диденкул, Л. В. Мних, З. В. Чумак, Н. В. Кузьмин

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

РОЛЬ КАЛЬЦИТРИОЛА В МОДУЛЯЦИИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ ДИСФУНКЦИИ У БЕРЕМЕННЫХ С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОЧЕК

Аннотация. Плейотропные эффекты витамина D (VD), активная форма которого синтезируется в почках, играют определенную роль в формировании и функционировании фетоплацентарной системы, в том числе при различных осложнениях беременности.

Цель работы – оценка уровня витамина D у беременных с плацентарной дисфункцией (ПД) и хроническими воспалительными заболеваниями почек (ХВЗП).

В течение 24–34 недель беременности обследовано 56 женщин с ПД (группа I – основная), 24 (42,85 %) из которых страдали хроническим пиелонефритом (группа IA). Контрольную группу (группа II) составила 31 условно здоровая беременная женщина. Уровень общего VD в крови определяли методом ИФА; в дополнение к общему стандартному клиническому исследованию было выполнено также бактериологическое исследование мочи.

Установлено, что средний уровень VD у беременных с ПД и хронической болезнью почек был значительно ниже, чем в контрольной группе (31,08 ± 7,2 и 45,42 ± 9,67 нг/мл ($p < 0,01$)). Оптимум VD выявлен только у 33,33 % беременных женщин в группе IA, в контрольной группе – у 93,55 % ($p < 0,01$), у 17,86 % обследованных в группе I и у 8,33 % беременных в группе IA был дефицит VD (OR = 2,09; ДИ 95 % – 1,8–2,42). Женщин с VD-дефицитным статусом в контрольной группе не было. У 58,33 % женщин в группе IA был субоптимальный уровень VD, в контрольной группе – у 6,45 % (OR = 3,57; ДИ 95 % – 1,62–7,88). Бактериурия диагностирована у всех беременных с VD-дефицитным или субоптимальным уровнем. При оптимальном уровне VD бактериурия определялась в 2 раза реже ($\chi^2 = 66,67$; $p < 0,01$). У пациентов с неадекватным уровнем VD ХВЗП диагностировали в 3,8 раза чаще (OR = 3,57; ДИ 95 % – 1,62–7,88).

Значительное снижение уровня кальцитриола у беременных с дисфункцией плаценты позволяет предположить, что дефицит или недостаточный уровень VD и воспалительные заболевания почек являются взаимозависимыми процессами, которые играют важную роль в формировании плацентарной дисфункции.

Ключевые слова: витамин D, плацентарная дисфункция, заболевания почек

Для цитирования: Роль кальцитриола в модуляции плацентарной дисфункции у беременных с хроническими заболеваниями почек / Г. С. Манасова [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 493–499. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-493-499

Gulsym S. Manasova, Natalia V. Didenkul, Ljudmila V. Mnich, Zinaida V. Chumak, Natalia V. Kuzmin

Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

ROLE OF CALCITRIOL IN MODULATING OF PLACENTAL DYSFUNCTION IN PREGNANT WOMEN WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

Abstract. The pleiotropic effects of vitamin D (VD), whose active form is synthesized in the kidneys, play a certain role both in forming and functioning the feto-placental system, including various pregnancy complications.

The aim of the study was to evaluate the vitamin D status in pregnant women with placental dysfunction (PD) and chronic inflammatory kidney disease (CIKD).

During 24–34 pregnancy weeks, 56 pregnant women with PD were examined (main group – I); 24 patients (42.85 %) had chronic pyelonephritis (group IA). The control group (group II) had 31 conditionally healthy pregnant women. The total VD level in the blood was determined by ELISA; in addition to the general clinical standard examination, the urine also underwent bacteriological examination.

The VD mean level in pregnant women with PD and CIKD was significantly lower than that in the control group (31.08 ± 7.2 and 45.42 ± 9.67 ng/ml ($p < 0.01$)). Only 33.33 % of pregnant women in group IA had a VD optimum, as well as 93.55 % ($p < 0.01$) in the control group and 17.86 % in group I. 8.33 % of pregnant women had a VD deficiency in group IA (RR = 2.09; CI 95 % – 1.8–2.42). The patients with a VD-deficiency were absent in the control group. 58.33 % of women in group IA had a suboptimal VD level and 6.45% in the control group (RR = 3.57; CI 95 % – 1.62–7.88). Bacteriuria was observed in all pregnant women with a VD-deficient or suboptimal level. At the optimum VD level, bacteriuria was diagnosed twice less ($\chi^2 = 66.67$; $p < 0.01$). In patients with an inadequate VD level, CIKD was diagnosed 3.8 times more (RR = 3.57; CI 95 % – 1.62–7.88).

A significantly calcitriol reduction in pregnant women with placental dysfunction suggests that the deficiency or the suboptimal level of vitamin D and inflammatory kidney diseases may be the interdependent processes that play a decisive role in the formation of placental dysfunction.

Keywords: vitamin D, placental dysfunction, kidney disease

For citation: Manasova G. S., Didenkul N. V., Mnich L. V., Chumak Z. V., Kuzmin N. V. Role of calcitriol in modulating of placental dysfunction in pregnant women with chronic kidney disease. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 493–499 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-493-499

Введение. Хронические воспалительные заболевания почек (ХВЗП) занимают второе место среди экстрагенитальной патологии у беременных [1]. Частота хронического пиелонефрита у беременных, по данным разных авторов, составляет от 12 до 15 %. Гестационный пиелонефрит – одна из основных причин, приводящих к развитию тяжелых гестозов [2], а в 15–20 % случаев он является причиной невынашивания беременности [3]. У 12–15 % детей, рожденных от матерей с заболеваниями почек, наблюдается синдром задержки развития плода [4].

Несмотря на известную роль ХВЗП в формировании патологии беременности, патогенетические механизмы развития этих осложнений остаются неуточненными и выбор эффективных методов профилактики осложнений беременности на фоне ХВЗП ограничен.

Влияние ХВЗП на развитие осложнений гестационного процесса может быть объяснено физиологической ролью почек в активации гормональной системы витамин D (VD)/рецепторы VD: именно в почках завершается синтез активной формы VD – кальцитриола (1α,25(OH)D3). По данным литературы, в настоящее время VD-гормону отводится определенная роль в обеспечении имплантационного окна и последующих первой и второй волн инвазии трофобласта [5, 6]. Кальцитриол участвует также в регуляции синтеза и секреции половых гормонов, синтезируемых как яичниками, так и плацентой [7]. Установлена определенная связь между уровнем VD в крови беременных женщин и частотой, а также степенью тяжести преэклампсии [8].

Непосредственно в почках под действием 1α-гидроксилазы неактивный 25(OH)D превращается в D-гормон – кальцитриол [9]. В почках также вырабатывается фермент 24-гидроксилаза, который обладает противоположным действием и деактивирует кальцитриол в его неактивную форму – 24,25(OH)D3 [10].

В ряде исследований показано, что у пациентов с заболеваниями почек средние уровни VD достоверно ниже, чем у здоровых людей, а его недостаточный уровень (≤25 нмоль/л) ассоциируется с инфекцией мочевыводящих путей [11, 12]. К наиболее часто персистирующим в мочевыводящих путях микроорганизмам относится *Escherichia coli*, которой отводится ведущая роль в обострении хронических воспалительных заболеваний почек во время беременности [13]. При тестировании способности сыворотки крови беременных женщин с различным уровнем VD ингибировать рост *E. coli* установлено, что сыворотки с уровнем VD выше 80 нмоль/л достоверно чаще ингибировали рост *E. coli*, чем при уровне 50 нмоль/л и ниже ($p < 0,05$) [14].

Цель работы – определение витамин D-статуса у беременных с плацентарной дисфункцией и хроническими заболеваниями почек.

Материалы и методы исследования. После получения информированного согласия пациентов обследовано 87 беременных в сроке 24–34 недели беременности. В основную группу (группа I) вошли 56 беременных с ПД на фоне верифицированного перинатального инфицирования, 24 (42,85 %) из которых страдали хроническим пиелонефритом (группа IA). Группу контроля (группа II) составила 31 условно здоровая женщина с физиологическим течением беременности.

Общеклинические и специальные обследования по оценке состояния фетоплацентарного кровообращения у внутриутробного плода проводили в соответствии с требованиями нормативных документов.

Для верификации перинатального инфицирования использовали методы бактериоскопического, бактериологического и иммуноферментного (ИФА) анализа.

Диагноз плацентарной дисфункции устанавливали на основании совокупности данных ультразвукового обследования с проведением фето- и плацентометрии, Doppler-оценки кровотока, кардиотокографии, оценки биофизического профиля плода, исследования гормональной функции

плаценты (хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и эстриол). Уровень ХГЧ и эстриола определяли методом иммуноферментного анализа на аппарате Cobas Integra 400 Plus (Roche Diagnostics, Швейцария). УЗИ проводили на аппарате Samsung Medison UGEOWS80A (Samsung Medison CO, LTD, 2014г., Корея), кардиотокографическое исследование плода – с помощью фетальных кардиомониторов *Sonicade* с соблюдением критериев Доуза–Редмана.

Уровень сывороточного 25(OH)D, который является основным циркулирующим метаболитом VD, определяли при постановке диагноза «плацентарная дисфункция» методом твердофазного ИФА, основанного на принципе конкурентного связывания, на анализаторе Cobas Integra 400 Plus (Roche Diagnostics, Швейцария).

У всех пациенток проводили бактериологическое исследование мочи с определением чувствительности выделенной флоры к антибиотикам.

Статистический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения Biostat, Statistica 6.0 фирмы Install Shield Software Corporation (США). Для расчета достоверности полученных результатов использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение. Пациенты всех групп были сопоставимы по возрасту и антропометрическим данным. Так, индекс массы тела в группе контроля составил 22,8 ± 1,93 условные единицы (у. е.) ($p > 0,05$), у пациенток основной группы – 22,2 ± 1,7 у. е. Средний возраст в группе контроля составил 30,35 ± 3,12 года, в основной группе – 29,21 ± 4,3 года ($p > 0,05$).

Первородящими в основной группе были 71,43 % пациентов, в контрольной – 55,00 % ($p < 0,05$), повторнородящими (2-е и 3-и роды) – 28,57 и 45,00 % соответственно ($p < 0,05$).

Оценка состояния гемодинамики в маточно-плодово-плацентарном кровотоке с применением ультразвукового/допплерометрического исследования показала, что у 62,50 % беременных имелось нарушение плодово-плацентарного кровотока IБ степени, что свидетельствовало о нарушениях гемодинамики непосредственно в пупочной артерии; у 23,21 % – IА степени (нарушение кровообращения в маточных артериях). У 14,29 % нарушений гемодинамики ни в артериях пуповины, ни в артериях матки не обнаружено (рис. 1). Случаев нарушения конечного диастолического кровотока не выявлено.

Известно, что основным эстрогенным гормоном, по уровню которого можно оценить состояние фетоплацентарной системы, является свободная фракция эстриола. По результатам исследований, у 35,71 % беременных с ПД уровень эстриола был менее 1 нг/мл (при норме 1,0–3,5 нг/мл), а у 7,14 % – более 3,5 нг/мл. У 57,14 % беременных с ПД и нарушениями гемодинамики уровень эстриола определялся в пределах нормативных значений.

Функциональное состояние маточно-плодово-плацентарного комплекса определяется прежде всего гемодинамическими изменениями, выявляемыми при допплерометрии. Так, по данным допплерометрии, нарушения кровообращения были выявлены у 85,71 % беременных с дисфункцией плаценты, тогда как нарушение гормональной функции плаценты – только у 42,85 % женщин с ПД.

При исследовании уровня VD в крови беременных установлено, что среднее содержание общего метаболита кальцитриола у пациенток с ПД и хроническим пиелонефритом (31,08 ± 7,2 нг/мл) достоверно ниже, чем у здоровых беременных с физиологическим течением гестационного процесса (45,42 ± 9,67 нг/мл) ($p < 0,01$) (рис. 2).

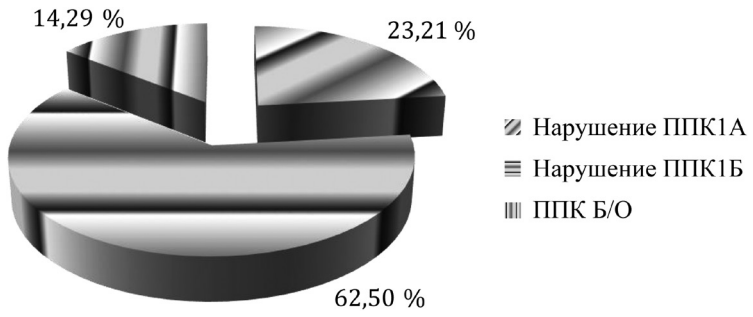


Рис. 1. Частота гемодинамических нарушений в системе маточно-плодово-плацентарного кровообращения

Fig. 1. Frequency of hemodynamic disorders in the utero-fetal-placental circulation system

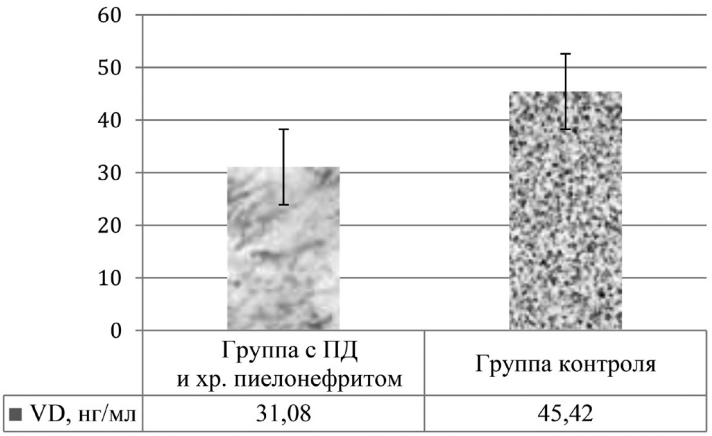


Рис. 2. Содержание общего метаболита кальцитриола у пациенток с плацентарной дисфункцией (ПД) и хроническим пиелонефритом

Fig. 2. Indicator of total calcitriol metabolite in the patients with placental dysfunction and chronic pyelonephritis

Анализ VD статуса в группе беременных с ПД показал, что у 17,86 % из них имеется дефицит VD (<20 нг/мл), при наличии хронических воспалительных заболеваний дефицит VD выявлен у 8,33 % женщин этой группы (RR = 2,09; CI 95 % – 1,8–2,42). Пациенток с VD-дефицитным статусом в контрольной группе не выявлено.

У 58,33 % беременных с ПД и хроническим пиелонефритом диагностирован субоптимальный уровень VD (<30 нг/мл). В группе контроля субоптимальный уровень VD был лишь у 6,45 % беременных (RR = 3,57; CI 95 % – 1,62–7,88) (рис. 3).

Согласно «Методическим рекомендациям по лечению и профилактике дефицита VD у населения стран Центральной Европы» (2013), в дополнительном назначении препаратов VD нуждаются пациенты и с субоптимальным, и с VD-дефицитным статусом.

Оптимальный уровень VD выявлен только у 33,33 % беременных с хроническим пиелонефритом; в группе контроля – у 93,55 % ($p < 0,01$).

Полученные данные позволяют предположить, что клиническое значение, по-видимому, имеет снижение VD в крови до субоптимальных показателей. Достоверно большее количество женщин с субоптимальным уровнем VD на фоне хронического пиелонефрита и ПД (58,33 %) по сравнению с

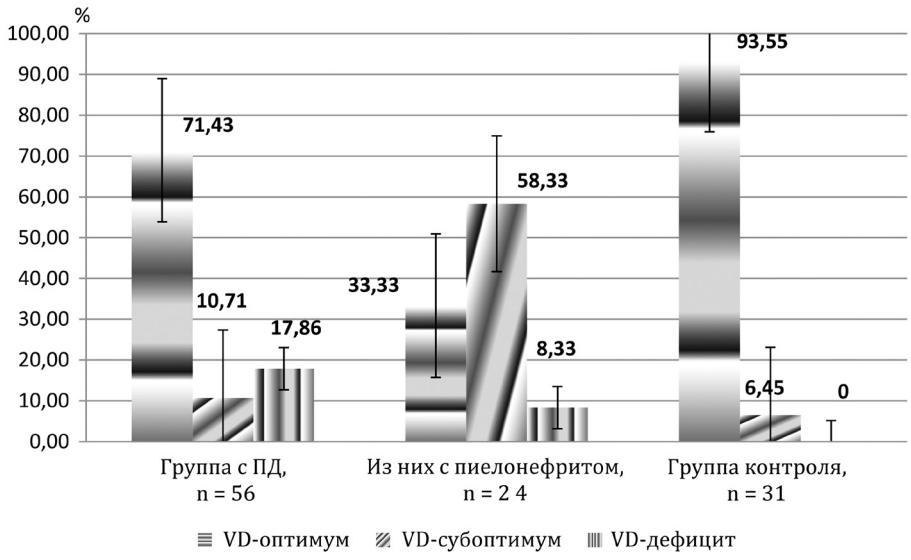


Рис. 3. Характеристика беременных с плацентарной дисфункцией (ПД), хроническим пиелонефритом и здоровых беременных по VD-статусу

Fig. 3. VD status characterization of pregnant women with placental dysfunction and chronic pyelonephritis and of healthy pregnant women

количеством таких беременных из группы условно здоровых пациенток (6,45 %) свидетельствует, скорее всего, о длительном персистирующем влиянии синдрома системного воспалительного процесса на функцию почек и об участии последних в синтезе активной формы VD. Представляется вполне закономерным его снижение в крови беременных.

Вероятно, нарушение синтеза фермента 1α-гидроксилазы в почечной ткани вследствие воспалительного процесса может играть ключевую роль в снижении количества кальцитриола в крови. С другой стороны, учитывая обсуждаемую в последние годы информацию об иммунологической роли VD и его участии в обеспечении иммунного ответа организма [15, 16], можно предположить, что его недостаток, в свою очередь, играет определенную роль в персистенции синдрома воспалительного ответа в мочевыделительной системе.

Результаты бактериологического исследования посевов мочи у беременных обследуемых групп оценивали в соответствии с Рекомендациями Европейского общества урологов [17]. Микробиологическим критерием бактериурии было ее выявление ($\geq 10^5$ КОЕ уропатогенов одного вида) в двух последовательно собранных пробах средней порции мочи или в одной пробе, собранной путем катетеризации. Кроме того, учитывали, что бессимптомная бактериурия имеет место при нормальном анализе мочи и может отсутствовать при наличии клинических проявлений и лейкоцитурии.

Бактериурия выявлена как у условно здоровых беременных (18,70 %), так и у беременных с ПД (66,07 %) ($\chi^2 = 45{,}06$; $p < 0{,}001$). При наличии хронического пиелонефрита рост бактериальной микрофлоры получен в 75 % случаев, у четверти пациенток с заболеваниями почек посевы мочи были стерильными (рис. 4).

У условно здоровых беременных с бессимптомной бактериурией какие-либо клинические проявления воспалительного процесса отсутствовали.

Основными возбудителями инфекций мочевых путей у беременных были представители кишечной группы микроорганизмов (*Escherichia colli*, *Enterococcus faecalis*), что согласуется с данными литературы. Кроме того, видовой состав микрофлоры характеризовался выделением *Corynebacterium spp.* и *Enterobacter amnigeus* у беременных с пиелонефритом ($\chi^2 = 9{,}42$; $p < 0{,}05$ и $\chi^2 = 5{,}13$; $p < 0{,}05$). Известно, что данная группа микроорганизмов отличается выраженной патогенностью и агрессивностью. У беременных основной группы *E. coli* высевалась в 2 раза чаще, чем в группе контроля (22,73 % против 11,11 %; $\chi^2 = 4{,}39$, $p < 0{,}05$). У здоровых беременных частота носительства *Staphylococcus epidermidis* составила 22,22 % против 9,09 % у беременных с ХВЗП ($\chi^2 = 6{,}45$; $p < 0{,}05$).

При определении возможной взаимосвязи VD статуса беременных с частотой бактериурии установлено, что у всех женщин с уровнем VD в крови менее 30 нг/мл имелась бактериурия.

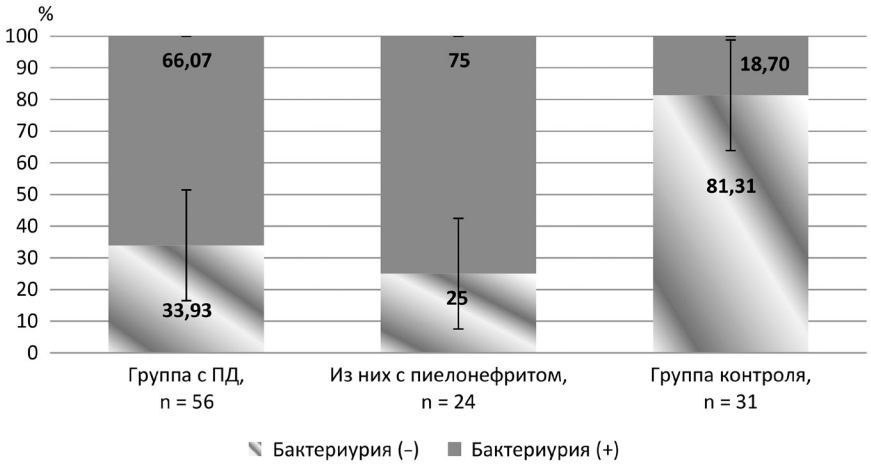


Рис. 4. Частота бактериурии у беременных с плацентарной дисфункцией (ПД), хроническим пиелонефритом (из них) и у условно здоровых беременных

Fig. 4. Bacteriuria frequency in pregnant women with placental dysfunction and chronic pyelonephritis and in conditionally healthy pregnant women

При оптимальной концентрации кальцитриола бактериурия диагностировалась в 2 раза реже ($\chi^2 = 66{,}67$; $p < 0{,}01$). Данный результат можно объяснить иммунологическими эффектами кальцитриола, в частности его участием в регуляции адаптивного и врожденного иммунитета, иммуномодуляции и иммуногенезе [18]. По-видимому, недостаточный уровень VD в крови может приводить первоначально к обсеменению условно-патогенной и патогенной микрофлорой с последующей реализацией патогенных возможностей этой микрофлоры.

Заключение. Результаты исследования VD-статуса у беременных с ПД и хроническими заболеваниями почек показали следующее:

1) средний уровень VD у беременных с ПД и хроническим пиелонефритом достоверно ниже, чем у условно здоровых беременных (31,08 ± 7,2 и 45,42 ± 9,67 нг/мл соответственно ($p < 0{,}01$)).

2) у всех беременных с VD-дефицитным или субоптимальным его уровнем в крови (<30 нг/мл) наблюдалась бактериурия. При оптимальной концентрации кальцитриола бактериурия диагностировалась в 2 раза реже ($\chi^2 = 66{,}67$; $p < 0{,}01$).

3) у пациенток с недостаточным уровнем кальцитриола в крови в 3,8 раза чаще отмечалась заболеваемость хроническим пиелонефритом (RR = 3,57; CI 95 % – 1,62–7,88).

Учитывая физиологические механизмы синтеза и метаболизма кальцитриола с непосредственным участием в этих процессах почек, а также иммунотропные эффекты VD, можно предположить, что недостаток VD и воспалительные заболевания почек могут быть взаимозависимыми процессами, которые являются фактором риска развития плацентарной дисфункции.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Urinary tract infection as a preventable cause of pregnancy complications: opportunities, challenges, and a global call to action / N. M. Gilbert [et al.] // Glob. Adv. Health. Med. – 2013. – Vol. 2, N 5. – P. 59–69. https://doi.org/10.7453/gahmj.2013.061

2. Каптильный, В. А. Инфекция мочевыводящих путей во время беременности / В. А. Каптильный // Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева. – 2015. – № 4. – С. 10–19.

3. Пересада, О. А. Инфекции мочевыводящих путей у беременных: современные подходы к диагностике и лечению / О. А. Пересада // Мед. новости. – 2012. – № 8. – С. 13–20.

4. Егорова, Я. А. Задержка внутриутробного развития плода в перинатальной медицине (обзор) / Я. А. Егорова, В. А. Заболотнов, А. Н. Рыбалка // Здоровье женщины. – 2015. – № 4 (100). – С. 48–51.

5. Витамин D и репродуктивное здоровье женщин / С. Ю. Калиниченко [и др.] // Проблемы репродукции. – 2016. – Т. 22, № 4. – С. 28–36.

6. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms are associated to spontaneous preterm birth and maternal aspects / I. N. Javorski [et al.] // Gene. – 2018. – Vol. 642. – P. 58–63. https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.087

7. Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granulosa cells / Z. Merhi [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2014. – Vol. 99, N 6. – P. 1137–1145. https://doi.org/10.1210/jc.2013-4161

8. Мальцева, Л. И. Витамин D и преэклампсия / Л. И. Мальцева, Э. Н. Васильева, Т. Г. Денисова // Рос. вестн. акушера-гинеколога. – 2016. – Т. 16, № 1. – С. 79–83.

9. Мальцев, С. В. Метаболизм витамина D и пути реализации его основных функций / С. В. Мальцев, Г. Ш. Мансурова // Практ. медицина. – 2014. – № 9 (85). – С. 12–18.

10. Михайлова, Н. А. Селективный активатор витамин-D-рецепторов парикальцитол и его место в лечении хронической болезни почек. Обзор литературы / Н. А. Михайлова // Лечащий врач. – 2011. – № 2. – С. 82.

11. Shalaby, S. A. Vitamin D deficiency is associated with urinary tract infection in children / S. A. Shalaby, N. M. Handoka, R. E. Amin // Arch. Med. Sci. – 2018. – Vol. 14, N 1. – P. 115–121. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63262

12. The association between serum levels of vitamin D and recurrent urinary tract infections in premenopausal women / W. Nseir [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 17, N 12. – P. e1121–e1124. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.06.007

13. Гордовская, Н. Б. Бессимптомная бактериурия у беременных: диагностика и лечение / Н. Б. Гордовская, Ю. В. Коротчаева // Альманах клин. медицины. – 2014. – № 30. – С. 57–60.

14. The impact of vitamin D on the innate immune response to uropathogenic *Escherichia coli* during pregnancy / N. L. Ramos [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2015. – Vol. 21, N 5. – P. 482.e1–482.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.010

15. Vitamin D and inflammatory cytokines in healthy and preeclamptic pregnancies / D. Barrera [et al.] // Nutrients. – 2015. – Vol. 7, N 8. – P. 6465–6490.

16. Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells / M. T. Cantorna [et al.] // Nutrients. – 2015. – Vol. 7, N 4. – P. 3011–3021. https://doi.org/10.3390/nu7043011

17. Локшин, К. Л. Актуальные вопросы диагностики и лечения бессимптомной бактериурии и острых циститов у беременных / К. Л. Локшин // Эффективная фармакотерапия. Урология и нефрология. – 2014. – № 3 (32). – С. 22–26.

18. Kikuta, J. Current topics on vitamin D. The effects of vitamin D on the immune system / J. Kikuta, M. Ishii // Clin. Calcium. – 2015. – Vol. 25, N 3. – P. 359–365.

References

1. Gilbert N. M., O'brien V. P., Hultgren S., Macones G., Lewis W. G., Lewis A. L. Urinary tract infection as a preventable cause of pregnancy complications: opportunities, challenges, and a global call to action. *Global Advances in Health and Medicine*, 2013, vol. 2, no. 5, pp. 59–69. https://doi.org/10.7453/gahmj.2013.061

2. Kaptil'nyi V. A. Infection of the urinary tract during pregnancy. *Arkhiv akusherstva i ginekologii imeni V. F. Snegireva* [Archive of obstetrics and gynecology named after V. F. Snegireva], 2015, no. 4, pp. 10–19 (in Russian).

3. Peresada O. A. Infections of the urinary tract in pregnant women: modern approaches to the diagnosis and treatment. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2012, no. 8, pp. 13–20 (in Russian).

4. Egorova Ya. A., Zabolotnov V. A., Rybalka A. N. Delay in fetal development in perinatal medicine (review). *Zdorov'e zhenshchiny* [Women's health], 2015, no. 4 (100), pp. 48–51 (in Russian).

5. Kalinchenko S. Yu., Zhilenko M. I., Gusakova D. A., Tyuzikov R., Mskhalaya G. Zh., Sablin K. S., Dymova A. V. Vitamin D and women's reproductive health. *Problemy reproduktsii* [Problems of reproduction], 2016, vol. 22, no. 4, pp. 28–36 (in Russian).

6. Javorski N., Lima C. A. D., Silva L. V. C., Crovella S., de Silva J. A. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms are associated to spontaneous preterm birth and maternal aspects. *Gene*, 2018, vol. 642, pp. 58–63. https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.087

7. Merhi Z., Doswell A., Krebs K., Cipolla M. Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2014, vol. 99, no. 6, pp. 1137–1145. https://doi.org/10.1210/jc.2013-4161

8. Mal'tseva L. I., Vasil'eva E. N., Denisova T. G. Vitamin D and preeclampsia. *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa* [Russian bulletin of the obstetrician-gynecologist], 2016, vol. 16, no. 1, pp. 79–83 (in Russian).

9. Mal'tsev S. V., Mansurova G. Sh. Vitamin D metabolism and ways to implement its main functions. *Prakticheskaya meditsina* [Practical medicine], 2014, no. 9 (85), pp. 12–18 (in Russian).

10. Mikhailova N. A. Selective activator of vitamin D receptors paricalcitol and its place in the treatment of chronic kidney disease. Literature review. *Lechashchii vrach* [Attending doctor], 2011, no. 2, p. 82 (in Russian).

11. Shalaby S. A., Handoka N. M., Amin R. E. Vitamin D deficiency is associated with urinary tract infection in children. *Archives of Medical Sciences*, 2018, vol. 14, no. 1, pp. 115–121. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63262

12. Nseir W., Taha M., Nemarny H., Mograbi J. The association between serum levels of vitamin D and recurrent urinary tract infections in premenopausal women. *International Journal of Infectious Diseases*, 2013, vol. 17, no. 12, pp. e1121–e1124. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.06.007

13. Gordovskaya N. B., Korotchaeva Yu. V. Asymptomatic bacteriuria in pregnant women: diagnosis and treatment. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny* [Clinical medicine almanac], 2014, no. 30, pp. 57–60 (in Russian).

14. Ramos N. L., Sekikubo M., Kironde F., Mirembe F., Sääf M., Brauner A. The impact of vitamin D on the innate immune response to uropathogenic *Escherichia coli* during pregnancy. *Clinical Microbiology and Infection*, 2015, vol. 21, no. 5, pp. 482.e1–482.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.010

15. Barrera D., Díaz L., Noyola-Martínez N., Halhali A. Vitamin D and inflammatory cytokines in healthy and preeclamptic pregnancies. *Nutrients*, 2015, vol. 7, no. 8, pp. 6465–6490. https://doi.org/10.3390/nu7085293

16. Cantorna M. T., Snyder L., Lin Y. D., Yang L. Vitamin D and 1.25 (OH) 2D regulation of T cells. *Nutrients*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 3011–3021. https://doi.org/10.3390/nu7043011

17. Lokshin K. L. Actual issues of diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria and acute cystitis in pregnant women. *Effektivnaya farmakoterapiya. Urologiya i nefrologiya* [Effective pharmacotherapy. Urology and nephrology], 2014, no. 3 (32), pp. 22–26 (in Russian).

18. Kikuta J., Ishii M. Current topics on vitamin D. The effects of vitamin D on the immune system. *Clinical Calcium*, 2015, vol. 25, no. 3, pp. 359–365 (in Japanese).

Информация об авторах

Манасова Гульсым Серикбаевна – д-р мед. наук, профессор. Одесский национальный медицинский университет (ул. Маршала Говорова, 28, 65009, г. Одесса, Украина). E-mail: gulsymmanasova@gmail.com. http: orcid.org/0000-0002-1600-5215

Диденкул Наталья Васильевна – аспирант. Одесский национальный медицинский университет (ул. Маршала Говорова, 28, 65009, г. Одесса, Украина). E-mail: didenkunatalya@gmail.com. http: orcid.org/0000-0002-2766-2894

Мних Людмила Владимировна – канд. мед. наук, доцент. Одесский национальный медицинский университет (ул. Маршала Говорова, 28, 65009, г. Одесса, Украина).

Чумак Зинаида Васильевна – канд. мед. наук. Одесский национальный медицинский университет (ул. Маршала Говорова, 28, 65009, г. Одесса, Украина).

Кузьмин Наталья Васильевна – аспирант. Одесский национальный медицинский университет (ул. Маршала Говорова, 28, 65009, г. Одесса, Украина). E-mail: tata_od_us@ukr.net

Information about the authors

Gulsym S. Manasova – D. Sc. (Med.), Professor. Odessa National Medical University (28, Marshal Govorov Str., 65009, Odessa, Ukraine). E-mail: gulsymmanasova@gmail.com. http: orcid.org/0000-0002-1600-5215

Natalia V. Didenkul – Postgraduate student. Odessa National Medical University (28, Marshal Govorov Str., 65009, Odessa, Ukraine). E-mail: didenkunatalya@gmail.com. http: orcid.org/0000-0002-2766-2894

Ljudmila V. Mnich – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Odessa National Medical University (28, Marshal Govorov Str., 65009, Odessa, Ukraine).

Zinaida V. Chumak – Ph. D. (Med.). Odessa National Medical University (28, Marshal Govorov Str., 65009, Odessa, Ukraine).

Natalia V. Kuzmin – Postgraduate student. Odessa National Medical University (28, Marshal Govorov Str., 65009, Odessa, Ukraine). E-mail: tata_od_us@ukr.net

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

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 616.419-018.4+60]:616.71-018.4-003.93
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-500-508

Поступила в редакцию 03.06.2020
Received 03.06.2020

А. А. Жерносеченко

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОСТЕОГЕННОМ ПОТЕНЦИАЛЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И СОЗДАНИИ БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ РЕПАРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Аннотация. В статье суммируются современные представления об остеогенном потенциале мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и опыте применения различных носителей для восстановления костной ткани. Понимание реализации программы остеогенеза в МСК сможет существенно расширить возможности применения этих клеток в составе биоинженерных конструкций. На сегодняшний день накоплен большой объем экспериментальных данных по изучению механизма остеогенной дифференцировки МСК, индукторов трансформации МСК в предшественники остеогенеза и созданию эквивалентов костной ткани биоинженерным путем с применением различных носителей. Особое внимание уделяется разработке материалов носителей и их проектированию, методам получения конструкций и взаимодействиям между скэффолдом и клетками, так как это имеет большое значение для дальнейшего функционирования биоинженерной ткани.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, остеогенная дифференцировка, носитель

Для цитирования: Жерносеченко, А. А. Современные представления об остеогенном потенциале мезенхимальных стволовых клеток и создании биоинженерных конструкций для репарации костной ткани / А. А. Жерносеченко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 500–508. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-500-508

Hanna A. Zhernasechanka

Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus

MODERN CONCEPTS OF THE OSTEOGENIC POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND THE CREATION OF BIOENGINEERING STRUCTURES FOR BONE TISSUE REPAIR

Abstract. The following review summarizes the latest studies on *in vitro* osteogenic mesenchymal stem cell differentiation and selection of scaffolds that can maintain the viability and functional activity of these cells for bone tissue repair. In the last time, there have been investigated a lot of issues such as the stimulation and development osteogenic differentiation of MSCs, the growth factors – inducers of osteogenesis in MSCs, the creation of 3D constructions of cells in different scaffolds. A deeper understanding of the osteogenic differentiation mechanisms can result in the novel therapeutic opportunities of bone disease treatment. Special attention is given to materials for scaffold designs and template–cell interactions, which is of great importance for the structuring and functioning of an engineered tissue.

Keywords: mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, scaffold

For citation: Zhernasechanka H. A. Modern concepts of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells and the creation of bioengineering structures for bone tissue repair. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 500–508 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-4-500-508

© Жерносеченко А. А., 2020

Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток (МСК) впервые была описана Friedenstein с соавт. в конце 1960-х – начале 1970-х годов. Так как первые МСК были выделены из костного мозга, то естественно наличие высокого потенциала дифференцировки у этих клеток в остеогенном направлении. В настоящее время известно, что МСК обладают высокой пластичностью, но впервые была описана именно остеогенная дифференцировка этих клеток [1–3]. Первоначально для подтверждения получения *in vitro* из МСК предшественников остеоцитов оценивали синтез клетками щелочной фосфатазы, переход проколлагена I типа под влиянием аскорбиновой кислоты в коллаген I типа, его депонирование во внеклеточном матриксе, богатом ростовыми факторами и протеинами [1, 4]. Последующие исследования выявили и другие маркеры остеогенеза, такие как остеокальцин, остеопонин, остеонектин, а в финальной фазе развития остеобластов – гидроксиапатит [1, 4].

В состав внеклеточного матрикса нативной костной ткани входят фибриллярные структуры, 90 % из которых представлены коллагеном I типа, а также минорными коллагенами V и XII типа. Основная функция коллагенов заключается в поддержании адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток в остеоциты, а кроме того, они придают прочность и эластичность костной ткани. Коллаген V типа связан с гепарансульфатсодержащими протеогликанами, молекулами тромбоспондина и другими белками межклеточного матрикса. Коллаген XII типа взаимодействует с хондротинсульфатсодержащими протеогликанами, фибронектином, а также принимает участие в связывании межклеточных структур с клеточными элементами кости, выступая посредником между клетками и волокнами коллагенов I и V типа с неколлагеновыми протеинами [5]. Неколлагеновый компонент внеклеточного матрикса представлен гликопротеинами (остеонектин, фибронектин, ламинин), фосфопротеинами (остеопонтин) и протеогликанами (декорин), которые выполняют различные функции. Так, фибронектин, ламинин, остеонектин являются адгезивными белками. Остеокальцин – белок, связывающий и транспортирующий кальций, – прочно взаимосвязан с гидроксиапатитом. Остеопонтин и остеонектин участвуют в минерализации внеклеточного костного матрикса [5].

В начале процесса остеодифференцировки МСК *in vitro* важным моментом является наработка клетками коллагена I типа и его секреция во внеклеточный матрикс, который максимально аккумулируется уже после первой недели дифференцировки [1, 6]. Со второй недели начинается минерализация внеклеточного матрикса [4]. После формирования конфлюэнтного монослоя клетки приобретают чувствительность к дифференцировочным агентам, поэтому этап пролиферации до начала минерализации является критическим моментом в плане объема получаемой костной ткани [1, 7, 8]. В серии исследований *in vitro* было показано, что остеогенез может быть индуцирован путем добавления питательных веществ и гидрокортизона, доказательством чего служил синтез щелочной фосфатазы, внеклеточного матрикса и внутриклеточного фосфата кальция [9].

Остеогенез является линейно последовательным процессом, контролируемым серией генов, при котором клетки проходят этапы созревания от остеопрогениторных клеток, преостеобластов, остеобластов до остеоцитов. При этом остеогенные клетки синтезируют белки, формирующие внеклеточный матрикс, в котором затем депонируется фосфат кальция в форме кристаллов гидроксиапатита. В начале остеогенной дифференцировки важные изменения можно отметить в морфологии МСК. Так, клетки изменяют форму от фибробластоподобной до близкой к шаровидной [10, 11]. Согласно литературным данным, на остеодифференцировку МСК влияют два типа воздействия – химические сигналы и физическое напряжение цитоскелета клеток [5].

Стабильность костной ткани сохраняется и регулируется комплексом взаимосвязей между остеобластами, остеоцитами и остеокластами. Остеобласты принимают участие в протеиновом синтезе, поддержании секреции матрикса и формировании здоровой ткани. В процессе минерализации некоторые зрелые остеобласты встраиваются в окружающий их матрикс и становятся основными компонентами зрелой костной ткани – остеоцитами, контактирующими друг с другом посредством отростков. Остеокласты, являясь специализированными макрофагами, вырабатывают спектр протеолитических ферментов и обеспечивают резорбцию костного матрикса, участвуя таким образом в обновлении костной ткани при ремоделировании кости. Хотя точный

молекулярный механизм неизвестен, было показано, что остеоциты могут прямо или опосредованно (через Wnt сигнальный путь) регулировать активность остеобластов и остеокластов [12].

На сегодняшний день признано три транскриптационных фактора, которые оказывают наибольшее влияние на регуляцию остеогенной дифференцировки МСК: Runx2 (Runt-связанный транскриптационный фактор 2), Sp7 (или osterix (Osx)) и Dlx5 (Distal-less homeobox 5) [12].

В зависимости от этапа дифференцировки Runx2 регулирует и индуцирует экспрессию определенных молекулярных маркеров. Так, в начале реализации программы остеогенеза поддерживается экспрессия генов, ответственных за пролиферацию, прогрессию клеточного цикла и биосинтез внеклеточного матрикса. Позднее гены, ответственные за пролиферацию, подавляются, но в то же время происходит стимулирование генов, контролирующих созревание и организацию внеклеточного матрикса [12–14].

Первые данные о роли Runx2 в дифференцировке МСК в остеобласты были получены в 1997 г. [12]. Активность Runx2 зависит от его концентрации и времени дифференцировки. В начале дифференцировки отмечается его высокий уровень, а на поздних стадиях, начиная со стадии зрелых остеобластов, он постепенно снижается до полного отсутствия на стадии финальных остеоцитов [12, 15]. Кроме того, высокий уровень Runx2 на поздних стадиях дифференцировки оказывает ингибиторных эффект, результатом чего становится редукция костной массы [12, 16].

Runx2 стимулирует экспрессию генов, характерных для костной ткани, таких как фактор транскрипции Osx, коллаген типа αI (*Coll1a1*), остеокальцин и костный сиалопротеин. Runx2, ALP, Coll1, трансформирующий фактор роста β (TGFβ1), остеонектин и костный морфогенетический белок (BMP-2) являются ранними маркерами остеодифференцировки, остеокальцин и остеопонтин экспрессируются позднее [6].

Индуцированные МСК экспрессируют транскриптационные факторы Sox9 и Runx2. Sox9 является преимущественно маркером хондрогенной дифференцировки, а Runx2 – остеогенной. Sox9 напрямую влияет на Runx2 и подавляет его активность. Экспериментально на мышах было показано, что снижение Sox9 является триггером остеогенеза, так как клетки дифференцируются в остеогенном направлении тогда, когда Sox9 экспрессируется на более низком уровне, чем Runx2. Ингибиторный эффект Sox9 на созревание остеобластов через подавление Runx2 – это основной механизм для определения остеохондропрогениторной судьбы клеток [17–19].

Кроме того, соотношение экспрессии генов *Runx2*/*Sox9* можно считать индикатором остеогенной чувствительности доноров. Было показано, что высокое соотношение *Runx2*/*Sox9* на 7-й день приводит к высокой активности щелочной фосфотазы на 14-й день, а ^{45}Ca инкорпорации – на 28-й день [17].

Osx был идентифицирован около 10 лет назад. Согласно современным исследованиям, он вовлечен в переключение клеток на остеогенную дифференцировку, играет важную роль в гомеостазе костной ткани, ингибирует поздние стадии остеогенеза. Ингибиторный эффект Osx подобен Runx2 [12, 20]. Sp7 стимулирует экспрессию генов коллагена I типа, костного сиалопротеина, остеопонтина, остеонектина, остеокальцина [5].

Еще одним транскриптационным фактором, который регулирует дифференцировку остеобластов в остеокласты, является Dlx5 – ключевой белок, регулирующий созревание остеобластов, который действует на ранних стадиях остеодифференцировки [5]. Dlx5 активируется BMP-2 [11, 21], а затем сам активирует Runx2 [22]. Кроме того, он способен стимулировать экспрессию ALP и остеокальцина Runx2-независимым путем [23]. Под влиянием гена Dlx5 экспрессируется также Sp7.

МСК, полученные из костного мозга, демонстрируют более высокий потенциал дифференцировки в остеогенном направлении, чем МСК, полученные из жировой ткани [9]. Остеогенная дифференцировка МСК *in vitro* легко стимулируется в монослойной культуре клеток путем добавления β-глицеролфосфата, гидрокортизона или дексаметазона и аскорбиновой кислоты. β-глицеролфосфат выступает в роли источника фосфата для минерализации костной ткани и индуцирует экспрессию остеогенных генов [7]. Дексаметазон – ключевой фактор, который индуцирует остеогенную дифференцировку путем регулирования экспрессии основного фактора остеогенной дифференцировки Runx2 [7], а кроме того, он обеспечивает минерализацию *in vitro* [17].

Аскорбиновая кислота способствует активации остеобластспецифических генов и является необходимым кофактором для ферментов, которые гидроксилируют пролин и лизин в проколлагене, обеспечивая таким образом секрецию Coll1 во внеклеточный матрикс. При ее отсутствии гидроксилирования пролина не происходит и цепи коллагена не способны сформировать свойственную им спиральную структуру [7]. Протоколы остеогенной дифференцировки, включающие применение дексаметазона, аскорбиновой кислоты и β-глицеролфосфата, часто применяют в экспериментальных тканеинженерных методиках или для подтверждения пластичности МСК, полученных из различных источников [7].

BMP – семейство ростовых факторов, локализованных в деминерализованном матриксе костной ткани, которые стимулируют дифференцировку остеобластов в остеоциты и могут быть использованы при остеоиндукции в исследованиях по восстановлению костной ткани [12]. BMP участвуют в двух работающих синергично сигнальных путях индукции экспрессии транскрипционных факторов Runx2, Osx и Dlx5: белок связывается с рецепторами на клетках-предшественницах остеобластов, что обеспечивает фосфорилирование белков цитоплазмы Smad-1, Smad-5, Smad-8, индуцирующих экспрессию генов остеогенеза, второй путь – через запуск системы передачи сигнала от рецепторов BMP по каскадному принципу активации протеинкиназ к транскрипционным факторам, отвечающим за остеогенез [5]. Применение BMP в качестве фактора дифференцировки увеличивает экспрессию как ранних остеобластспецифических маркеров, таких как щелочная фосфатаза, так и поздних – остеокальцина, остеопонина [24–26]. Тем не менее ряд авторов подтверждают дифференцировку МСК в остеогенном направлении и в отсутствие представителей BMP-семейства [27–29].

Индукторами остеогенеза в МСК могут выступать и другие ростовые факторы: представители суперсемейства TGFβ, инсулиноподобный трансформирующий фактор 1 (IGF-1), ростовой фактор фибробластов (FGF), факторы роста тромбоцитов (PDGF) и факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) [12, 30].

Реконструкция обширного участка костной ткани требует тканеинженерного подхода, т. е. создания клеточной конструкции на основе носителя, при этом актуальным является сохранение жизнеспособности и функциональной активности клеток. Таким образом, материал, выбранный в качестве матрицы, играет ключевую роль, так как является каркасом, на котором будет происходить рост и образование костной ткани. Идеальный носитель для МСК должен обладать рядом характеристик: способностью к высокой клеточной адгезии и к сохранению клеток в имплантате; способностью к сохранению пролиферативного потенциала; биосовместимостью, предотвращающей иммунные реакции у реципиента после имплантации; остеоиндуктивностью; биопроводимостью, обеспечивающей свободную диффузию питательных веществ и кислорода; структурой и механическими свойствами, сходными с таковыми в нативной костной ткани. Кроме того, он должен обладать способностью поддерживать васкуляризацию и степень деградации носителя, соотносимую с образованием новой костной ткани [9, 11, 31].

Таким образом, выбор клеточного носителя для создания биотрансплантата имеет первостепенное значение в исследованиях различных скэффолдов с целью их дальнейшего применения в клинической практике.

Сегодня наиболее часто используются фибриновый гель, кальций фосфат, альгинат-гидрогель, бета-трикальцийфосфат, гидроксиапатит, коллаген.

Фибрин – это натуральный фиброзный высокомолекулярный протеин, включенный в процесс свертывания крови. Он полимеризуется из фибриногена под воздействием фермента тромбина в сетчатую структуру и формирует гемостатический сгусток совместно с тромбоцитами над раневой поверхностью. Фибриновый матрикс способен поддерживать как пролиферацию, так и дифференцировку внесенных в него МСК. Кроме того, его преимуществом является способность сформировать непрерывную границу с костной тканью в месте имплантации [32].

Кальций фосфат – один из неорганических материалов, обнаруженных в костной ткани и обладающих биосовместимостью и остеоиндуктивностью [9]. Установлено, что кальций фосфат не только является матрицей для МСК, но может стимулировать остеогенную дифференцировку клеток, а также содействовать образованию костной ткани *in vivo* [33].

Синтетический бета-трикальцийфосфат – это безводный фосфат кальция, который создан в качестве заменителя костной ткани для устранения дефектов кости. Высокая пористость материала способствует легкому проникновению внутрь клеток, нанесенных на его поверхность, и хорошей диффузии биологических жидкостей. Эти характеристики определяют его использование в различных исследованиях в качестве клеточного носителя при репарации костной ткани.

Альгинат-гидрогель – натуральный полимер, получаемый из бурых водорослей. Существует способ доставки клеток в составе альгинатных микрошариков и кальция фосфата, который является составной частью нативной костной ткани [32].

H. Yuan с соавт. были исследованы два типа трикальций фосфата – α-TCP и β-TCP. Данные носители были имплантированы в спинную мускулатуру собак. Гистологический анализ на 30, 45 и 150-е сутки выявил более высокое заселение клетками внутри пор β-TCP, чем при применении α-TCP. Отмечалось также образование костной ткани на 45-е и 150-е сутки при использовании β-TCP, чего не наблюдалось при анализе α-TCP. С другой стороны, костная ткань при применении β-TCP на 150-е сутки имела дегенеративные признаки [34]. J. Liu с соавт. [35] изучали влияние α-TCP на остеогенную дифференцировку МСК у крыс. МСК крыс в синтетическом α-TCP инкубировали в остеоиндуктивной среде с последующим анализом уровня экспрессии генов *ALP*, *Runx2*, *Coll1* и *Sp7* ПЦР-методом. Было установлено, что α-TCP имеет хорошую биосовместимость с МСК крыс и в присутствии остеоиндукционной среды способствует росту уровней mRNA *ALP, Runx2, Coll1* и *Sp7.* После 21 дня культивирования наблюдали образование кальция.

Гидроксид фосфат кальция (гидроксиапатит) составляет около 50 % костной ткани. Поэтому искусственно созданный гидроксиапатит наряду с β-TCP находит широкое применение в регенеративной медицине и травматологии для заполнения костных дефектов. H. Yuan с соавт. имплантировали в спинную мускулатуру собак гидроксиапатит с крупными порами, стенки которых имели неровности и содержали микропоры (S-HA), а также другой вариант гидроксиапатита – с гладкими стенками пор с равномерно распределенными в них кристаллическими зернышками (J-HA). Спустя 3 и 6 мес. после введения проводили гистологический и микрорадиографический анализ. При использовании S-HA отмечалось формирование костной структуры и последующее ее увеличение к 6-му месяцу. В то же время при использовании J-HA не выявлено формирования костной структуры ни на 3-й, ни на 6-й месяц наблюдений. Это исследование показало, что архитектура гидроксиапатита, используемого в качестве носителя, влияет на остеоиндуктивные свойства, которые может развить данный носитель [36].

Götz W. с соавт. исследовали остеоиндуктивные свойства коммерческого продукта NanoBone®, представляющего собой нанокристаллический гидроксиапатит, встроенный в кварцевый гель-матрикс. Данный носитель был имплантирован подкожно и внутримышечно в спинную область 18 свинок. Через 5 и 10 недель, 4 и 8 мес. исследуемые области были изучены с помощью гистологического и гистоморфометрического методов. Признаки раннего остеогенеза с последующим его усилением внутри и вокруг гранул наблюдались уже через 5 недель, а формирование костноподобных структур – на поздних сроках [37].

Коллаген – отличный кандидат для 3D-носителя, поскольку, являясь нативным компонентом костной ткани, обладает биосовместимостью, биодеградируемостью, способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку МСК. Но слабые механические свойства не позволяют использовать коллаген в качестве 3D-носителя, поэтому его модифицируют путем добавления полимеров или других биомолекул [38]. Так, G. Calabrese с соавт. [39] продемонстрировали высокий остеогенный потенциал МСК жировой ткани в составе носителя из комбинации коллагена и Mg-примесного гидроксиапатита. Примечательно, что МСК дифференцировались во взрослые остеобласты даже в отсутствие специфических индукционных факторов, а добавление ростовых факторов заметно ускоряло остеогенный процесс. J. I. Dawson с соавт. [40] показали, что матрица на основе коллагена I типа с включенными в ее состав кристаллами гидроксиапатита способна поддерживать остеодифференцировку МСК человека, что подтверждает интенсивный синтез клетками щелочной фосфатазы и внеклеточного матрикса с локализованными участками остеокальцина.

Таким образом, накоплен большой объем данных экспериментальных исследований по изучению механизмов остеогенной дифференцировки МСК и индукторов их трансформации в предшественники остеогенеза и по созданию эквивалентов костной ткани биоинженерным путем с применением различных носителей. Сегодня с участием небольшого числа пациентов проводятся многочисленные клинические исследования по изучению регенерации костной ткани, и в случае эффективности проводимых исследований полученные результаты могут стать основой для расширения методов оказания помощи в травматологии и ортопедии.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Hanna, H. *In vitro* osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties / H. Hanna, L. M Mir // Stem Cell Res. Ther. – 2018. – Vol. 9, N 1. – Art. 203. https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x

2. Friedenstein, A. J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of Guinea-pig bone marrow and spleen cells / A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan // Cell Proliferation. – 1970. – Vol. 3, N 4. – P. 393–403. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x

3. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues / A. J. Friedenstein [et al.] // Transplantation. – 1968. – Vol. 6, N 2. – P. 230–247.

4. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development / L. D. Quarles [et al.] // J. Bone Miner Res. – 1992. – Vol. 7, N 6. – P. 683–692. https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070613

5. Камилов, Ф. Х. Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и ее регуляция / Ф. Х. Камилов Е. Р. Фаршатова, Д. А. Еникеев // Фунд. исслед. – 2014. – № 7-4. – С. 836–842.

6. Vater, C. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells / C. Vater, P. Kasten, M. Stiehler // Acta Biomater. – 2011. – Vol. 7, N 2. – P. 463–477. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037

7. Langenbach, F. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro* / F. Langenbach, J. Handschel // Stem Cell Res. Ther. – 2013. – Vol. 4, N 5. – Art. 117. https://doi.org/10.1186/scrt328

8. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach / C. Granéli [et al.] // Stem Cell Res. – 2014. – Vol. 12, N 1. – P. 153–165. https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.009

9. Osteoblast-oriented differentiation of BMSCs by co-culturing with composite scaffolds constructed using silicon-substituted calcium phosphate, autogenous fine particulate bone powder and alginate *in vitro* / Y. Tian [et al.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8, N 51. – P. 88308–88319. https://doi.org/10.18632/oncotarget.19015

10. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation / P. Rodríguez [et al.] // J. Cell. Biochem. – 2004. – Vol. 93, N 4. – P. 721–731. https://doi.org/10.1002/jcb.20234

11. Жерносеченко, А. Выбор носителя и условий дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток для восстановления костной ткани / А. Жерносеченко, Я. Исайкина, Т. Михалевская // Наука и инновации. – 2019. – № 5. – С. 58–61.

12. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells from basic knowledge, animal models to clinical trials / G. Hutchings [et al.] // J. Clin. Med. – 2020. – Vol. 9, N 1. – Art. 139. https://doi.org/10.3390/jcm9010139

13. Role and regulation of Runx2 in osteogenesis / M. Bruderer [et al.] // Eur. Cell. Mater. – 2014. – Vol. 28. – P. 269–286. https://doi.org/10.22203/ecm.v028a19

14. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression / G. S. Stein [et al.] // Oncogene. – 2004. – Vol. 23. – P. 4315–4329. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207676

15. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not suffcient for osteoblast differentiation / M. H. Lee [et al.] // J. Cell. Biochem. – 1999. – Vol. 73, N 1. – P. 114–125.

16. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures / W. Liu [et al.] // J. Cell Biol. – 2001. – Vol. 155, N 1. – P. 157–166. https://doi.org/10.1083/jcb.200105052

17. *In vitro* osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio / C. Loebel [et al.] // Tissue Eng. Part A. – 2015. – Vol. 21, N 1–2. – P. 115–123. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0096

18. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors / H. Akiyama [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, N 41. – P. 14665–14670. https://doi.org/10.1073/pnas.0504750102

19. Dominance of Sox9 function over Runx2 during skeletogenesis / G. Zhou [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, N 50. – P. 19004–19009. https://doi.org/10.1073/pnas.0605170103

20. SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice / C. A. Yoshida [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, N 3. – P. e32364. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032364

21. BMP signals regulate Dlx5 during early avian skull development / N. Holleville [et al.] // Dev. Biol. – 2003. – Vol. 257, N 1. – P. 177–189. https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00059-9

22. BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network / M. Q. Hassan [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281, N 52. – P. 40515–40526. https://doi.org/10.1074/jbc.m604508200

23. Heo, J. S. Distal-less homeobox 5 is a master regulator of the osteogenesis of human mesenchymal stem cells / J. S. Heo, S. G. Lee, H. O. Kim // Int. J. Mol. Med. – 2017. – Vol. 40, N 5. – P. 1486–1494. https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3142

24. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation / M. Beederman [et al.] // J. Biomed. Sci. Eng. – 2013. – Vol. 6, N 8A. – P. 32–52. https://doi.org/10.4236/jbise.2013.68a1004

25. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells / H. H. Luu [et al.] // J. Orthop. Res. – 2007. – Vol. 25, N 5. – P. 665–677. https://doi.org/10.1002/jor.20359

26. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells / Q. Kang [et al.] // Stem Cells Dev. – 2009. – Vol. 18, N 4. – P. 545–559. https://doi.org/10.1089/scd.2008.0130

27. PDGF, TGF-β, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages / F. Ng [et al.] // Blood. – 2008. – Vol. 112, N 2. – P. 295–307. https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-103697

28. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after Injection / A. Lebouvier [et al.] // Stem Cell Res. Ther. – 2015. – Vol. 6, N 1. – Art. 68. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0036-y

29. Protocols for *in vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages / M. Ch. Ciuffreda [et al.] // Mesenchymal stem cells: methods and protocols, methods in molecular biology / ed. M. Gnecchi. – N. Y., 2016. – Vol. 1416. – P. 149–158.

30. How does the pathophysiological context influence delivery of bone growth factors? / X. Yu [et al.] // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2015. – Vol. 84. – P. 68–84. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.010

31. Мурзич, А. Э. Экспериментальное обоснование способа аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток для регенерации костной ткани головки бедра / А. Э. Мурзич, Л. А. Пашкевич, А. А. Жерносеченко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 7–19.

32. Zhou, H. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering / H. Zhou, H. H. K. Xu // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, N 30. – P. 7503–7513. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.045

33. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling / Y.-R. V. Shih [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – Vol. 111, N 3. – P. 990–995. https://doi.org/10.1073/pnas.1321717111

34. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP / H. Yuan [et al.] // J. Mater. SciMater Med. – 2001. – Vol. 12, N 1. – P. 7–13. https://doi.org/10.1023/A:1026792615665

35. The effect of synthetic α-tricalcium phosphate on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells / J. Liu [et al.] // Am. J. Transl. Res. – 2015. – Vol. 7, N 9. – P. 1588–1601.

36. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics / H. Yuan [et al.] // Biomaterials. – 1999. – Vol. 20, N 19. – P. 1799–1806. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00075-7

37. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig / W. Götz [et al.] // Folia Histochemica et Cytobiologica. – 2010. – Vol. 48, N 4. – P. 589–596. https://doi.org/10.2478/v10042-010-0096-x

38. Polo-Corrales, L. Scaffold Design for Bone Regeneration / L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, J. E. Ramirez-Vick // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2014. – Vol. 14, N 1. – P. 15–56. https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127

39. Collagen-hydroxyapatite scaffolds induce human adipose derived stem cells osteogenic differentiation *in vitro* / G. Calabrese [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, N 3. – P. e0151181. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151181

40. Development of specific collagen scaffolds to support the osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells / J. I. Dawson [et al.] // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, N 21. – P. 3105–3116. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.040

References

1. Hanna H., Mir L. M. *In vitro* osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018, vol. 9, no. 1, art. 203. https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x

2. Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of Guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 1970, vol. 3, no. 4, pp. 393–403. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x

3. Friedenstein A. J., Petrakova K. V., Kurolesova A. I., Frolova G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 1968, vol. 6, no. 2, pp. 230–247.

4. Quarles L. D., Yohay D. A., Lever L. W., Caton R., Wenstrup R. J. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1992, vol. 7, no. 6, pp. 683–692. https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070613

5. Kamilov F. Kh., Farshatova E. R., Enikeev D. A. Cell-molecular mechanisms of bone tissue remodeling and its regulation. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental research], 2014, no. 7-4, pp. 836–842 (in Russian).

6. Vater C., Kasten P., Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 2011, vol. 7, no. 2, pp. 463–477. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037

7. Langenbach F., Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro. Stem Cell Research and Therapy*, 2013, vol. 4, no. 117. https://doi.org/10.1186/scrt328

8. Granéli C., Thorfve A., Ruetschi U., Brisby H., Thomsen P., Lindahl A., Karlsson C. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Research*, 2014, vol. 12, no. 1, pp. 153–165. https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.009

9. Tian Y., Cui L.-H., Xiang S.-Y., Xu W.-X., Chen D.-Ch., Fu R., Zhou Ch.-L., Liu X.-Q., Wang Y.-F., Wang X.-T. Osteoblast-oriented differentiation of BMSCs by co-culturing with composite scaffolds constructed using silicon-substituted calcium phosphate, autogenous fine particulate bone powder and alginate *in vitro. Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 51, pp. 88308–88319. https://doi.org/10.18632/oncotarget.19015

10. Rodríguez P., González M., Ríos S., Cambiazo V. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004, vol. 93, no. 4, pp. 721–731. https://doi.org/10.1002/jcb.20234

11. Zhernosechenko A., Isaikina Ya., Mikhalevskaya T. The choice of scaffold and conditions for mesenchymal stem cells differentiation for the bone repair. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2019, no. 5, pp. 58–61 (in Russian).

12. Hutchings G., Moncrieff L., Dompe C., Janowicz K., Sibiak R., Bryja A. [et al.]. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells from basic knowledge, animal models to clinical trials. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, vol. 9, no. 1, art. 139. https://doi.org/10.3390/jcm9010139

13. Bruderer M., Richards R. G,. Alini M., Stoddart M. J. Role and regulation of Runx2 in osteogenesis. *European Cells and Materials*, 2014, vol. 28, pp. 269–286. https://doi.org/10.22203/ecm.v028a19

14. Stein G. S., Lian J. B., van Wijnen A. J., Stein J. L., Montecino M., Javed A., Zaidi S. K., Young D. W., Choi J.-Y., Pockwinse S. M. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*, 2004, vol. 23, pp. 4315–4329. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207676

15. Lee M. H., Javed A., Kim H. J., Shin H. I., Gutierrez S., Choi J. Y., Rosen V., Stein J. L., van Wijnen A. J., Stein G. S., Lian J. B., Ryoo H. M. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not suffcient for osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1999, vol. 73, no. 1, pp. 114–125.

16. Liu W., Toyosawa S., Furuichi T., Kanatani N., Yoshida C., Liu Y., Himeno M., Narai S., Yamaguchi A., Komori T. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *Journal of Cell Biology*, 2001, vol. 155, pp. 157–166. https://doi.org/10.1083/jcb.200105052

17. Loebel C., Czekanska E. M., Bruderer M., Salzmann G., Alini M., Stoddart M. J. In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. *Tissue Engineering. Part A*, 2015, vol. 21, no. 1–2, pp. 115–123. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0096

18. Akiyama H., Kim J.-E., Nakashima K., Balmes G., Iwai N., Deng J. M., Zhang Z., Martin J. F., Behringer R. R., Nakamura T., de Crombrugghe B. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no. 41, pp. 14665–14670. https://doi.org/10.1073/pnas.0504750102

19. Zhou G., Zheng Q., Engin F., Munivez E., Chen Y., Sebald E., Krakow D., Lee B. Dominance of Sox9 function over Runx2 during skeletogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no. 50, pp. 19004–19009. https://doi.org/10.1073/pnas.0605170103

20. Yoshida C. A., Komori H., Maruyama Z., Miyazaki T., Kawasaki K., Furuichi T. [et al.] SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *Public Library of Science One*, 2012, vol. 7, no. 3, p. e32364. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032364

21. Holleville N., Quilhac A., Bontoux M., Monsoro-Burq A.-H. BMP signals regulate Dlx5 during early avian skull development. *Developmental Biology*, 2003, vol. 257, no. 1, pp. 177–189. https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00059-9

22. Hassan M. Q., Tare R. S., Lee S. H., Mandeville M., Morasso M. I., Javed A., van Wijnen A. J., Stein J. L., Stein G. S., Lian J. B. BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, no. 52, pp. 40515–40526. https://doi.org/10.1074/jbc.m604508200

23. Heo J. S., Lee S. G., Kim H. O. Distal-less homeobox 5 is a master regulator of the osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, vol. 40, no. 5, pp. 1486–1494. https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3142

24. Beederman M., Lamplot J. D., Nan G., Wang J., Liu X., Yin L. [et al.]. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2013, vol. 6, no. 8A, pp. 32–52. https://doi.org/10.4236/jbise.2013.68a1004

25. Luu H. H., Song W.-X., Luo X., Manning D., Luo J., Deng Z.-L., Sharff K. A., Montag A. G., Haydon R. C., He T.-Ch. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 2007, vol. 25, no. 5, pp. 665–677. https://doi.org/10.1002/jor.20359

26. Kang Q., Song W.-X., Luo Q., Tang N., Luo J., Luo X. [et al.]. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells and Development*, 2009, vol. 18, no. 4, pp. 545–559. https://doi.org/10.1089/scd.2008.0130

27. Ng F., Boucher S., Koh S., Sastry K. S. R., Chase L., Lakshmipathy U., Choong C., Yang Z., Vemuri M. C., Rao M. S., Tanavde V. PDGF, TGF-β, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 2, pp. 295–307. https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-103697

28. Lebouvier A., Poignard A., Cavet M., Amiaud J., Leotot J., Hernigou P., Rahmouni A., Bierling P., Layrolle P., Rouard H., Chevallier N. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Research and Therapy*, 2015, vol. 6, no. 1, art. 68. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0036-y

29. Ciuffreda M. Ch., Malpasso G., Musarò P., Turco V., Gnecchi M. Protocols for *in vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York, 2016, vol. 1416, pp. 149–158.

30. Yu X., Suárez-González D., Khalil A. S., Murphy W. L. How does the pathophysiological context influence delivery of bone growth factors? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, vol. 84, pp. 68–84. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.010

31. Murzich A. E., Pashkevich L. A., Zhernosechenko A. A. Experimental justification of the method of mesenchymal stem cell autotransplantation for regeneration of the femoral head bone tissue. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 7–19 (in Russian).

32. Zhou H., Xu H. H. K. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 30, pp. 7503–7513. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.045

33. Shih Y.-R. V., Hwang Y., Phadke A., Kang H., Hwang N. S., Caro E. J. [et al.]. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, vol. 111, no. 3, pp. 990–995. https://doi.org/10.1073/pnas.1321717111

34. Yuan H., De Bruijn J. D., Li Y., Feng J., Yang Z., De Groot K., Zhang X. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2001, vol. 12, no. 1, pp. 7–13. https://doi.org/10.1023/A:1026792615665

35. Liu J., Zhao L., Ni L., Qiao Ch., Li D., Sun H., Zhang Z. The effect of synthetic α-tricalcium phosphate on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. *American Journal of Translational Research*, 2015, vol. 7, no. 9, pp. 1588–1601.

36. Yuan H., Kurashina K., de Bruijn J. D., Li Y., de Groot K., Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 1999, vol. 20, no. 19, pp. 1799–1806. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00075-7

37. Götz W., Lenz S., Reichert C., Henkel K.-O., Bienengräber V., Pernicka L., Gundlach K. K. H., Gredes T., Gerber T., Gedrange T., Heinemann F. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2010, vol. 48, no. 4, pp. 589–596. https://doi.org/10.2478/v10042-010-0096-x

38. Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J. E. Scaffold design for bone regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014, vol. 14, no. 1, pp. 15–56. https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127

39. Calabrese G., Giuffrida R., Fabbi C., Figallo E., Furno D. L., Gulino R., Colarossi C., Fullone F., Giuffrida R., Parenti R., Memeo L., Forte S. Collagen-hydroxyapatite scaffolds induce human adipose derived stem cells osteogenic differentiation *in vitro*. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 3, p. e0151181. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151181

40. Dawson J. I., Wahl D. A., Lanham S. A., Kanczler J. M., Czernuszka J. T., Oreffo R. O. C. Development of specific collagen scaffolds to support the osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 2008, vol. 29, no. 21, pp. 3105–3116. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.040

Информация об авторе

Жерносеченко Анна Александровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: sapphire.anna@gmail.com

Information about the author

Hanna A. Zhernasechanka – Researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: sapphire.anna@gmail.com

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

ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ

SCIENTISTS OF BELARUS

ИГОРЬ НИКОЛАЕВИЧ СЕМЕНЕНЯ

(К 60-летию со дня рождения)



22 ноября 2020 г. исполняется 60 лет талантливому белорусскому ученому и организатору науки, директору Республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», доктору медицинских наук, профессору, лауреату премии НАН Беларуси Игорю Николаевичу Семенене.

И. Н. Семененя родился в 1960 г. в г. Минске. В 1977 г. поступил на педиатрический факультет Минского государственного медицинского института (МГМИ), который окончил в 1983 г. по специальности «педиатрия» и получил квалификацию врача-педиатра. В 1982 г. принимал участие во Всесоюзной олимпиаде по педиатрии в г. Риге, по результатам которой награжден Почетной грамотой ЦК ЛКСМ Латвии за второе место в личном зачете. С 1983 г. И. Н. Семененя – стажер-преподаватель кафедры нормальной физиологии МГМИ, с 1984 г. – ассистент этой кафедры.

После аварии на Чернобыльской АЭС в 1986 г. И. Н. Семененя перешел на работу в лабораторию иммунологии детского возраста МГМИ младшим научным сотрудником. На протяжении 1986–1990 гг. занимался вопросами организации иммунологической службы в республике, неоднократно выезжал в районы Могилевской, Гомельской и других областей для клинико-иммунологического обследования и коррекции нарушений иммунитета у пострадавших детей; получил статус участника ликвидации последствий аварии на ЧАЭС. В 1988 г. защитил кандидатскую диссертацию на тему «Центральные холинергические механизмы регуляции жирнокислотного состава и содержания холестерина липопротеидов плазмы крови при гипотермии и эмоциональном стрессе». В 1990–1995 гг. работал ассистентом кафедры фармакологии МГМИ.

С момента организации в 1995 г. в НАН Беларуси Отделения медико-биологических наук (далее – Отделение) и по 2003 г. работал ученым секретарем Отделения. Вместе с академиком-секретарем Отделения академиком В. Н. Гуриным (научным руководителем и научным консультантом по кандидатской и докторской диссертациям И. Н. Семенени) внес большой вклад в становление и развитие Отделения. Был избран председателем профкома аппарата НАН Беларуси.

В 1999 г. И. Н. Семененя удостоен премии НАН Беларуси за цикл трудов «Разработка экспериментальных моделей субфебрилитета и изучение механизмов такого нарушения терморегуляции». В 2000 г. ему присвоено ученое звание доцента. В 2001 г. защитил докторскую диссертацию на тему «Терморегуляторные процессы при экспериментальном субфебрилитете», а в 2003 г. ему присвоено ученое звание профессора.

Указом Президента Республики Беларусь от 23 января 2003 г. № 32 И. Н. Семененя назначен главным ученым секретарем Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь; являлся членом Президиума и коллегии ВАК. Указом Президента Республики Беларусь «О работе с руководящими кадрами в системе государственных органов и иных государственных организаций» от 26 июля 2005 г. № 354 И. Н. Семененя включен в кадровый резерв Главы государства на замещение должности первого заместителя Председателя ВАК. За время работы в ВАК в 2003–2006 гг.

И. Н. Семененя принял активное участие в совершенствовании работы по реализации государственной политики в области аттестации научных кадров высшей квалификации, обеспечении эффективной подготовки кандидатов и докторов наук.

После ухода из ВАК в 2006 г. И. Н. Семененя работал деканом факультета повышения квалификации руководящих работников и специалистов частного учреждения образования «БИП – Институт правоведения». При его активном участии организованы новые курсы повышения квалификации, в частности, работников риэлтерских организаций, введены новые специальности переподготовки, получило развитие дистанционное образование на факультете.

В 2007 г. И. Н. Семененя возглавил отдел науки Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Руководя отделом, он сосредоточил внимание на организации разработки приоритетных направлений развития медицинской науки, обеспечении межведомственной и междисциплинарной интеграции научных исследований, повышении эффективности внедрения результатов научных исследований и разработок в практическое здравоохранение, организации работы Ученого медицинского совета Министерства здравоохранения, обеспечении эффективной подготовки научных кадров высшей квалификации и др. В то время И. Н. Семененя являлся членом Комиссии по обеспечению охраны прав и противодействию нарушениям в сфере интеллектуальной собственности при Совете Министров Республики Беларусь, членом рабочей группы Государственной комиссии по вопросам медико-биологического обеспечения государственной безопасности при Совете Безопасности Республики Беларусь, главным редактором научно-практического ежегодника «Достижения медицинской науки Беларуси», научным консультантом Белорусской энциклопедии и др.

В 2008–2010 гг. И. Н. Семененя заочно обучался в Институте государственной службы Академии управления при Президенте Республики Беларусь по специальности «государственное управление национальной экономикой», которую окончил с отличием и благодарностью руководства вуза.

После ухода из Министерства здравоохранения в 2011 г. И. Н. Семененя работал ученым секретарем Республиканского научно-практического центра психического здоровья. В этот период им подготовлены материалы для аккредитации центра как научной организации, сформированы и согласованы с ВАК документы для открытия в центре аспирантуры по специальностям «психиатрия», «наркология» и «медицинская психология».

В 2011 г. И. Н. Семененя перешел на работу в Департамент по ликвидации последствий катастрофы на ЧАЭС Министерства по чрезвычайным ситуациям Республики Беларусь (Госчернобыль) на должность начальника отдела научного обеспечения и международного сотрудничества; являлся членом Национальной комиссии Беларуси по радиационной защите при Совете Министров Республики Беларусь и др. Добросовестный и эффективный труд И. Н. Семенени в развитии международного сотрудничества в области преодоления последствий аварии на ЧАЭС отмечен благодарственными письмами Министра иностранных дел Республики Беларусь В. В. Макея, представителей Организации по безопасности и сотрудничеству в Европе, зачислением И. Н. Семенени в резерв кадров главного управления многосторонней дипломатии МИД Республики Беларусь и награждением его двумя почетными грамотами Госчернобыля.

После ухода в отставку с государственной службы в декабре 2017 г. И. Н. Семененя в январе 2018 г. назначен директором Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси в г. Гродно (далее – Институт). Работая в этой должности, И. Н. Семененя провел большую организационную работу по созданию в Институте трех отраслевых лабораторий и оснащению их современным научным оборудованием на сумму около 1,5 млн долларов США из средств инновационного фонда Гродненского облисполкома, что позволило значительно расширить научные и прикладные возможности Института.

С целью повышения эффективности научной, научно-технической, инновационно-производственной и научно-образовательной деятельности при активном участии И. Н. Семенени в 2018 г. создан образовательно-научный кластер Гродненщины, включающий Институт, Гродненский государственный медицинский университет и 5 областных учреждений здравоохранения.

И. Н. Семененей проводится систематическая работа по укреплению научно-технологических связей Института с промышленными предприятиями Гродненщины и других регионов республики.

Расширяется география международного сотрудничества, выполняются совместные проекты с Казахстаном, Китайской Народной Республикой, Республикой Польша, налаживается взаимодействие с Узбекистаном, Пакистаном, другими странами.

Под руководством И. Н. Семенени организованы и проведены II Белорусский биохимический конгресс «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (2018), 1-я Белорусско-польско-литовская научная конференция «Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм», посвященная 250-летию А. Снядецкого (2018), международная научно-практическая конференция «Актуальные медико-биологические проблемы алкогольной и других химических зависимостей» (2019).

1 ноября 2019 г. на заседании Бюро Президиума НАН Беларуси И. Н. Семененей были доложены ближайшие и отдаленные перспективы развития Института, включающие 9 основных направлений: биохимия, молекулярная генетика и фармакотерапия алкогольной зависимости; поиск и исследование биологически активных веществ природного происхождения для создания новых лекарственных средств и стандартных образцов; создание новых форм лекарственных средств с повышенной биодоступностью; изучение роли химических элементов в процессах жизнедеятельности, оценка содержания незаменимых факторов питания в организме и окружающей среде, разработка технологий предупреждения их недостаточности; разработка новых технологий прогнозирования, предупреждения и коррекции нарушений жизнедеятельности; изучение влияния психических состояний человека на экспрессию генов, регулирующих работу биохимических и физиологических систем организма, развитие болезней; комплексное изучение процессов жизнедеятельности в рамках полного жизненного цикла у поколений животных, обитающих на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника с разным уровнем радиоактивного загрязнения; оценка состояния общественного здоровья по анализу содержания психоактивных веществ и продуктов метаболизма человека в бытовых сточных водах централизованной канализации; развитие производства.

Все изложенные направления получили одобрение на заседании Бюро Президиума НАН Беларуси в связи с их актуальностью. В то же время было предложено сосредоточиться в первую очередь на решении фундаментальных и прикладных проблем алкогольной зависимости, учитывая ее высокую общемировую значимость и колоссальный ущерб, который наносит алкоголизм человечеству.

Активная деятельность И. Н. Семенени на посту директора Института позволила поднять за последние три года среднемесячную зарплату в Институте более чем в 2 раза; решается вопрос укрупнения Института в форме создания в г. Гродно филиала в виде научно-производственной базы.

В настоящее время Игорь Николаевич является председателем совета по защите диссертаций Д 01.30.01 (специальность 03.01.04 биохимия по биологической отрасли науки) при Институте, членом Ученого медицинского совета Министерства здравоохранения Республики Беларусь, членом комиссии по проведению ведомственной научно-технической экспертизы проектов (работ, мероприятий), представляемых для финансирования с привлечением средств инновационного фонда Гродненского облисполкома, председателем научно-редакционного совета журнала «Охрана труда. Технологии безопасности» и др.

Профессор И. Н. Семененя – известный ученый в области ряда актуальных проблем физиологии и медицины, в том числе автор трудов философско-методологического характера. Основные его работы посвящены проблемам терморегуляции в норме и при патологии, изучению влияния радиационного фактора после аварии на ЧАЭС на иммунную систему организма детей, развитию нового научно-практического направления в медицине – хронохирургии. Ряд работ И. Н. Семенени посвящен вопросам совершенствования управления медицинской наукой, разработке проблем социальной кибернетики, методологическому значению правила исходного состояния в физиологии и медицине, обоснованию новых форм регуляции функций организма, проблемам космической экологии человека, взаимосвязи науки и религии, происхождения и смысла

жизни, разработке теории нейропсихического (психоэнергетического) поля как квантовой основы процессов мышления, роли психики в механизмах здоровья и болезней, вопросам патогенеза и терапии нейроинфекций, изучению новых эффектов и механизмов действия лекарственных средств из групп фибратов, тиазолидиндионов и бигуанидов, влияющих на углеводный и липидный обмен, в отношении подавления алкогольной мотивации через PPAR-рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом в ЦНС, фармакологической коррекции обмена аминокислот в организме при субтотальной ишемии головного мозга, этиопатогенезу вторичных эритроцитозов, феномену спонтанной регрессии злокачественных опухолей, изучению влияния противоопухолевых и противоэмбриональных антител на опухолевые клетки, выяснению эффектов лекарственных средств растительного происхождения на микроциркуляторное русло, проблеме отрицательного побочного действия лекарств, в том числе их канцерогенной опасности, оценке возможной опасности америция-241 чернобыльского происхождения, истории биологического оружия и др.

И. Н. Семененя имеет большой опыт педагогической деятельности. Работая в МГМИ, он преподавал на четырех кафедрах – нормальной физиологии, патологической физиологии, фармакологии, микробиологии с вирусологией и иммунологией. По совместительству работал профессором кафедры физиологии и биохимии в Белорусском государственном университете физической культуры, профессором кафедры психологии в Институте правоведения. На протяжении ряда лет И. Н. Семененя по совместительству работал заведующим лабораторией прикладной физиологии в Институте физиологии НАН Беларуси и др.

Результаты научной и научно-популярной деятельности И. Н. Семенени изложены более чем в 680 печатных работах, 4 монографиях. Он – соавтор 3 изобретений, под его руководством подготовлены и защищены 3 кандидатские диссертации.

Видный ученый с широкой эрудицией, талантливый организатор науки, прекрасный педагог и обаятельный человек, Игорь Николаевич Семененя снискал глубокое уважение и заслуженный авторитет среди научной и медицинской общественности не только нашей республики, но и за ее пределами. В свои 60 лет он сохраняет поразительную работоспособность, полон творческих идей.

Коллектив Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, ученики и коллеги сердечно поздравляют Игоря Николаевича с юбилеем, желают ему крепкого здоровья на многие годы и больших творческих успехов.