

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2021. Том 18, № 2

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2021. Том 18, № 2

Журнал основан в 2004 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

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

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

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

- С. А. Красный** – Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь
- Н. П. Митьковская** – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
- С. П. Рубникович** – Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь
- И. Н. Семененя** – Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- Р. Р. Сидорович** – Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Республика Беларусь
- А. В. Строцкий** – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
- А. В. Сукало** – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
- Л. П. Титов** – Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь
- С. И. Третьяк** – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Редакционный совет

- Эдуардас Алекнавичиус** – Национальный институт рака, Вильнюс, Литовская Республика
- Ю. В. Вороненко** – Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, Киев, Украина
- Марк М. Ван Гулле** – Университет Лёвена, Лёвен, Королевство Бельгия
- Драган Дьюрич** – Институт медицинской физиологии Ричарда Бьюриана Университета Белграда, Белград, Республика Сербия
- Т. П. Ключник** – Научный центр психического здоровья, Москва, Российская Федерация
- В. А. Кульчицкий** – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- Марк-Антуан Кусто** – Анжерский университет, Анже, Французская Республика
- А. И. Мартынов** – Медицинский центр Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Российская Федерация
- Р. Г. Оганов** – Российское кардиологическое общество, Москва, Российская Федерация
- Н. Д. Савенкова** – Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия, Санкт-Петербург, Российская Федерация
- В. И. Стародубов** – Российская академия наук, Москва, Российская Федерация
- М. В. Угрюмов** – Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
- И. А. Чешик** – Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

Адрес редакции:

ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 272-19-19; e-mail: medvesti@mail.ru.
Сайт: vestimed.belnauka.by.

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия медицинских наук. 2021. Том 18, № 2
Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *Л. И. Кудерко*

Подписано в печать 05.05.2021. Выход в свет 28.05.2021. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 48 экз. Заказ 90.
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,38 руб., ведомственная подписка – 29,38 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

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

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук, 2021

PROCEEDINGS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICAL SERIES, 2021, vol. 18, no. 2

The Journal was founded in 2004

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

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

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

Editor-in-Chief

Nikolai S. Serdiuchenko – Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences
of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Editorial Board

Oleg O. Rummo (*Associate Editor-in-Chief*) – Minsk Scientific-Practical Center of Surgery, Transplantation and
Hematology, Minsk, Republic of Belarus

Valentina G. Kolosovskaya (*Managing Editor*)

Yulia E. Eremenko – Republican Center for Research and Practice in Otolaryngology, Minsk, Republic
of Belarus

Mikhail A. Gerasimenko – Republican Scientific-Practical Center of Traumatology and Orthopedics, Minsk,
Republic of Belarus

Gennady L. Gurevich – Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Tuberculosis, Minsk,
Republic of Belarus

Siarhei V. Hubkin – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic
of Belarus

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

Sergey A. Krasny – N. N. Alexandrov National Cancer Centre, Minsk, Republic of Belarus

Natalya P. Mitkovskaya – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Sergey P. Rubnikovich – Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Igor N. Semenenya – Institute of Biochemistry of Biologically Active Substances of the National Academy
of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

Ryszard R. Sidorovich – Republican Research and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk,
Republic of Belarus

Aleksandr V. Strockij – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Alexander V. Sukalo – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

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

Stanislaw I. Tretyak – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Frantishek I. Vismont – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Editorial Council

Eduardas Aleknavicius – National Cancer Institute, Vilnius, Republic of Lithuania

Igor A. Cheshik – Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

Mark-Antoine Custaud – University of Angers, Angers, French Republic

Dragan Djuric – Richard Buryan Medical Physiology Institute of the University of Belgrade, Belgrade, Republic of Serbia

Mark M. Van Hulle – University of Leuven, Leuven, Kingdom of Belgium

Tatiana P. Klyushnik – Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation

Vladimir A. Kulchitsky – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Anatoly I. Martynov – Medical Center of the Administration of the President of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Raphael G. Oganov – Russian Cardiology Society, Moscow, Russian Federation

Nadezhda D. Savenkova – St. Petersburg State Pediatric Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Vladimir I. Starodubov – Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Mikhail V. Ugryumov – Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Yuri V. Voronenko – National Medical Academy of Postgraduate Education named after P. L. Shupik, Kyiv, Ukraine

Address of the Editorial Office:

1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.

Phone: +375 17 272-19-19; e-mail: medvesti@mail.ru.

Website: vestimed.belnauka.by.

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Medical series, 2021, vol. 18, no. 2.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*

Computer imposition *L. I. Kudzerko*

It is sent of the press 05.05.2021. Appearance 28.05.2021. Format 60×84 ¹/₈. Offset paper. The press digital.

Printed pages 14.88. Publisher's signatures 16.4. Circulation 48 copies. Order 90.

Number price: individual subscription – 12.38 byn., departmental subscription – 29.38 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka"

Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer, distributor of printing editions No. 1/18 dated August 2, 2013. License for the press No. 02330/455 dated December 30, 2013. Address: 40, F. Scorina Str., Minsk, 220141, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series, 2021

ЗМЕСТ

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Чепелев С. Н., Висмонт Ф. И., Губкин С. В., Маслов Л. Н. Кардиопротекторная эффективность фармакологического посткондиционирования с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с транзиторной гиперхолестеринемией.....	135
Пронько Т. П., Снежицкий В. А., Горчакова О. В., Степура Т. Л., Гладкий М. Л. Влияние полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов <i>P2RY12</i> , <i>ITGB3</i> и фермента-метаболизатора цитохрома <i>CYP2C19</i> на активность тромбоцитов и эффективность клопидогрела у пациентов со стабильной стенокардией напряжения, проживающих в Гродненском регионе.....	147
Эйсмонт О. Л. Причины послеоперационных передних болей при тотальном эндопротезировании коленного сустава.....	160
Федянин С. Д. Рациональная антимикробная терапия и стимуляция раневого заживления у пациентов с хирургической инфекцией.....	169
Адамович А. Ю., Нижегородова Д. Б., Шадрина В. К., Дыбов О. Г., Старостин А. М., Владимирская Т. Э., Воробей А. В., Зафранская М. М. Иммуномодулирующий эффект клеточной терапии на экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника.....	177
Карлович Н. В., Спиридонова О. С., Сазонова Е. Г., Мохорт Т. В. Определение референтного интервала паратгормона у пациентов с различными стадиями хронической болезни почек.....	186
Рубникович С. П., Дедова Л. Н., Семижон П. А., Денисова Ю. Л., Кандрукевич О. В. Особенности экспресс-диагностики в периодонтологии (на <i>англ. яз.</i>).....	196
Босякова Е. В., Титовец Э. П. Исследование действия некоторых препаратов, применяемых в клинике, на активность AQP1 мембраны эритроцитов человека.....	204
Величко И. М., Лелевич С. В., Лелевич В. В. Изменения дофаминергической системы в гипоталамусе и среднем мозге крыс при хронической комплексной алкогольно-морфиновой интоксикации.....	212
Волчек А. В., Дубовик Б. В. Противовоспалительные свойства комбинации мелоксикама и N-ацетил-L-пролина.....	220
Горячко А. Н., Сукало А. В. Прогностическая модель для определения вероятности развития врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела.....	228
Давидовский С. В., Ибрагимова Ж. А., Костюк Д. Д., Леонов Н. Н., Микицкий Ю. М., Скугаревская М. М., Третьяк А. Н., Кужаль В. В. Анализ социально-психологических факторов, сопряженных с суицидальным поведением лиц призывного возраста (на <i>англ. яз.</i>).....	234
Гончарова Е. В., Тарутин И. Г., Петкевич М. Н. Количественная оценка дозиметрических параметров плана лучевого лечения при незапланированном изменении схемы фракционирования.....	244
Махмутов Р. Ф. Лимфаденопатия как маркер первичной формы Эпштейна–Барр вирусной инфекции, рекуррентных респираторных заболеваний и аденовирусной инфекции у детей.....	252

CONTENTS**CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE**

Chepelev S. N., Vismont F. I., Goubkin S. V., Maslov L. N. Cardioprotective efficiency of pharmacological postconditioning using lactic acid in ischemia-reperfusion of the myocardium in rats with transitional hypercholesterolemia	135
Pronko T. P., Snezhitskiy V. A., Gorchakova O. V., Stepuro T. L., Gladkiy M. L. Effect of polymorphism of platelet receptors genes <i>P2RY12</i> , <i>ITGB3</i> and <i>CYP2C19</i> cytochrome metabolizer enzyme on the platelet activity and efficiency of clopidogrel in patients with stable stenocardia in the Grodno region	147
Eismont O. L. Anterior knee pain causes after total knee arthroplasty	160
Fedzianin S. D. Rational antimicrobial therapy and wound healing stimulation in patients with surgical infection	169
Adamovich H. Yu., Nizheharodava D. B., Shadryna V. K., Dybau A. G., Starastin A. M., Vladimirskaia T. E., Varabei A. U., Zafranskaya M. M. Immunomodulatory effect of cell therapy on the experimental inflammatory bowel disease model	177
Karlovich N. V., Spiridonova O. S., Sazonova E. G., Mokhort T. V. Determination of the parathyroid hormone reference interval in patients with different stages of the chronic kidney disease	186
Rubnikovich S. P., Dedova L. N., Semizhon P. A., Denisova Yu. L., Kandrukevich O. V. Specific characteristics of rapid diagnosis in periodontology	196
Basiakova K. V., Titovets E. P. Study of the effect of some drugs used in the clinic on the AQPI activity of the human erythrocyte membrane	204
Vialichko I. M., Lelevich S. V., Lelevich V. V. Changes in the dopaminergic system in the hypothalamus and mid-brain of rats at chronic complex alcohol-morphine intoxication	212
Vauchok A. U., Dubovik B. V. Anti-inflammatory properties of the combination of meloxicam and N-acetyl-L-proline	220
Harachka A. N., Sukalo A. V. Prognostic model for determining the probability of developing congenital pneumonia in preterm infants with low body weight	228
Davidouski S. V., Ibragimova J. A., Kastsiuk D. D., Leonov N. N., Mikitski Yu. M., Skuhareuskaya M. M., Tretyk A. N., Kuzhal V. V. Analysis of socio-psychological factors associated with suicidal behavior in persons of military age	234
Hancharova E. V., Tarutin I. G., Piatkevich M. N. Quantitative assessment of dosimetric parameters of the radiation treatment plan for unplanned changes in the fractionation scheme	244
Makhmutov R. F. Lymphadenopathy as a marker of the primary form of Epstein-Barr of viral infection, recurrent respiratory diseases and adenovirus infection in children	252

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА
CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 616.127-005-085-092.9:616.153
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-135-146>

Поступила в редакцию 25.01.2021
Received 25.01.2021

С. Н. Чепелев¹, Ф. И. Висмонт¹, С. В. Губкин², Л. Н. Маслов³

¹*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*

²*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

³*Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского
медицинского центра РАН, Томск, Российская Федерация*

**КАРДИОПРОТЕКТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО
ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ
ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У КРЫС С ТРАНЗИТОРНОЙ
ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ**

Аннотация. Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смерти во всем мире: ни по какой другой причине ежегодно не умирает столько людей, сколько от сердечно-сосудистой патологии. Принимая во внимание высокую медицинскую и социальную значимость проблемы лечения пациентов с ишемической болезнью сердца и острым инфарктом миокарда, поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического повреждения миокарда и выяснение механизмов их реализации является актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины.

Целью исследования было экспериментально проверить кардиопротекторную эффективность фармакологического посткондиционирования с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с транзитной гиперхолестеринемией.

В ходе исследования установлено, что дистанционное ишемические посткондиционирование (ДИПостК) при ишемии-реперфузии миокарда приводит к повышению уровня лактата в крови крыс, что оказывает инфаркт-лимитирующий эффект. Выявлено, что введение в кровоток животным лактата в дозе 10 мг/кг через 25 мин после начала реперфузии, как и при ДИПостК, приводит к уменьшению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка. Фармакологическое посткондиционирование с помощью лактата не эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка крыс с транзитной гиперхолестеринемией. Наличие такого фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний, как гиперхолестеринемия, может служить критерием для исключения применения фармакологического посткондиционирования с помощью лактата в качестве способа уменьшения ишемических и реперфузионных повреждений миокарда у пациентов с острым инфарктом миокарда.

Ключевые слова: фармакологическое посткондиционирование, ишемия, реперфузия, кардиопротекторная эффективность, зона риска, зона некроза, гиперлактатемия, молочная кислота, транзитная гиперхолестеринемия, крысы

Для цитирования: Кардиопротекторная эффективность фармакологического посткондиционирования с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с транзитной гиперхолестеринемией / С. Н. Чепелев [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 135–146. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-135-146>

S. N. Chepelev¹, F. I. Vismont¹, S. V. Goubkin², L. N. Maslov³

¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

³*Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,
Tomsk, Russian Federation*

**CARDIOPROTECTIVE EFFICIENCY OF PHARMACOLOGICAL POSTCONDITIONING
USING LACTIC ACID IN ISCHEMIA-REPERFUSION OF THE MYOCARDIUM
IN RATS WITH TRANSITIONAL HYPERCHOLESTEROLEMIA**

Abstract. Cardiovascular disease is the leading cause of death all over the world: for no other reason as many people die every year as from the cardiovascular disease. Taking into account the high medical and social significance of the problem of treating patients with coronary heart disease and acute myocardial infarction, the search for new effective methods of preventing or weakening ischemic myocardial damage and revealing the mechanisms of their implementation is an urgent task of modern experimental and clinical medicine.

The aim of the study was to experimentally test the cardioprotective efficiency of pharmacological postconditioning with lactic acid in myocardial ischemia-reperfusion in rats with transient hypercholesterolemia.

In the course of the study, it was found that remote ischemic postconditioning (RIPostC) during myocardial ischemia-reperfusion leads to an increase in the level of lactate in the blood and has an infarction-limiting effect in rats. It was revealed that lactate, after injection into the bloodstream of animals at a dose of 10 mg/kg 25 minutes after the start of reperfusion, like RIPostC, leads to a decrease in the necrosis area in the left ventricular of the myocardium. Pharmacological postconditioning with lactate is ineffective in the limiting necrosis area in the myocardium of the left ventricle of rats with transient hypercholesterolemia. The presence of such a risk factor for cardiovascular diseases as hypercholesterolemia can serve as a criterion for excluding the use of pharmacological postconditioning with lactate as a way to reduce ischemic and reperfusion damage to the myocardium in patients with acute myocardial infarction.

Ключевые слова: pharmacological postconditioning, ischemia, reperfusion, cardioprotective efficiency, risk area, necrosis area, hyperlactatemia, lactic acid, transient hypercholesterolemia, rats

For citation: Chepelev S. N., Vismont F. I., Goubkin S. V., Maslov L. N. Cardioprotective efficiency of pharmacological postconditioning using lactic acid in ischemia-reperfusion of the myocardium in rats with transitional hypercholesterolemia. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 135–146 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-135-146>

Введение. В настоящее время ишемическая болезнь сердца (ИБС) является основной причиной смертности в развитых странах мира и в Республике Беларусь в частности [1]. Учитывая большую частоту инвалидизации и сложность реабилитации пациентов с инфарктом миокарда, ИБС представляет собой не только значимую медицинскую, но и важную государственную проблему. В связи с этим поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического повреждения миокарда и выяснение механизмов их реализации остается актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины [2–6].

В 2003 г. Z. Q. Zhao с соавт. [7] сообщили, что механическое посткондиционирование (ПостК), состоящее из коротких прерывистых циклов ишемии, чередующихся с реперфузией, после ишемического события может смягчить последствия реперфузионного повреждения. Согласно данным, полученным за последнее десятилетие в ряде фундаментальных научных и клинических исследований, ишемическое ПостК является эффективным методом снижения реперфузионного повреждения [4, 5, 7–9].

В последние годы объектом повышенного интереса ведущих мировых исследователей в области экспериментальной и клинической кардиологии являются кардиопротекторные (противоишемический и антиаритмический) эффекты дистантного ишемического пре- (ДИПреК) и посткондиционирования (ДИПостК), которые воспроизводятся ишемией конечностей, осуществляемой до и после острой ишемии миокарда соответственно [6, 10–12].

Для эффективного применения любого варианта прекодиционирования (ПреК) (локального или дистантного) как меры профилактической кардиопротекции необходимо точно знать, когда наступит ишемия, требующая защиты миокарда. Но поскольку это практически невозможно, то мощный кардиопротекторный потенциал ПреК, как правило, клинически не используется. Следовательно, ишемическое ПостК, особенно ДИПостК, имеющее несомненное преимущество перед различными вариантами ПреК, можно успешно применять в клинической практике наряду с другими рекомендациями. Во-первых, этот метод безопасен, дешев и малоинвазивен; во-вторых, его можно применять при оказании скорой медицинской помощи и ко всем пациентам с ишемией миокарда, получающим реперфузионное лечение.

К настоящему времени накоплен определенный объем знаний о феномене ишемического кондиционирования и его защитном влиянии на миокард. Однако биохимические механизмы кардиопротекции, лежащие в основе инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического кондиционирования и особенно ДИПостК при ишемии-реперфузии миокарда, все еще до конца не изучены [3, 5, 6, 9, 13].

Принимая во внимание тот факт, что гипоперфузия, ишемия органов и тканей приводят к повышению уровня молочной кислоты (лактата) в крови, которая оказывает коронарное сосудорасширяющее действие за счет выделения эндотелием сосудов монооксида азота (NO) [14, 15] и способна ингибировать перекисное окисление липидов и свободнорадикальные процессы [16], выраженность которых при реперфузии возрастает, и что лактат, используемый тканями и особенно миокардом после гипоксии, предпочтительнее глюкозы [17, 18], были основания по-

лагать, что повышение уровня лактата в крови (гиперлактатемия) позволит уменьшить реперфузионное повреждение миокарда, а соответственно, подтвердит выдвинутое нами предположение о его участии в реализации кардиопротекторных эффектов ДИПостК. Так, по результатам ранее проведенного нами исследования установлено, что повышенный уровень молочной кислоты в крови, который наблюдается после 15-минутной окклюзии обеих бедренных артерий через 10 мин после 30-минутной острой ишемии миокарда, инициирует кардиопротекторный эффект ДИПостК, а фармакологическое ПостК с помощью лактата, вводимого в дозе 10 мг/кг через 25 мин после начала реперфузии, оказывает инфаркт-лимитирующий эффект, близкий к наблюдаемому при ДИПостК [19, 20].

В клинической практике необходимость защиты миокарда от повреждения, вызванного ишемией и реперфузией, чаще всего необходима пациентам с различными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), к числу которых относится и гиперхолестеринемия (ГХЕ) [21, 22].

В то же время в современной литературе отсутствуют сведения, касающиеся изучения кардиопротекторной эффективности фармакологического ПостК с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда у крыс при наличии такого сопутствующего фактора риска ССЗ, как ГХЕ.

Цель исследования – экспериментально проверить кардиопротекторную эффективность фармакологического посткондиционирования с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с транзиторной гиперхолестеринемией.

Материалы и методы исследования. Исследование кардиопротекторной эффективности фармакологического ПостК с помощью молочной кислоты проведено на 55 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах массой 210 ± 20 г, возрастом 4 ± 1 мес. Из них, с учетом выживаемости животных после острой ишемии миокарда (ОИМ) и последующих процедур, для обработки и анализа результатов исследования было отобрано 44 крысы.

Все животные в начале эксперимента случайным образом были разделены на 4 группы: 1-я – физиологический раствор + ишемия-реперфузия (Физ. р-р + И/Р) – группа животных ($n = 12$), которым на протяжении 10 дней интрагастрально с помощью зонда вводили 0,9 %-ный раствор NaCl в дозе 10 мл/кг 1 раз в сутки с последующей ишемией (30 мин) и реперфузией (120 мин) миокарда; 2-я – ГХЕ + ишемия-реперфузия (ГХЕ + И/Р) – группа животных ($n = 13$), которым на протяжении 10 дней интрагастрально с помощью зонда вводили 10 %-ный раствор холестерина (Sigma-Aldrich, США) на оливковом масле в дозе 10 мл/кг 1 раз в сутки с последующей ишемией (30 мин) и реперфузией (120 мин) миокарда; 3-я – физиологический раствор + ишемия-реперфузия + лактат (Физ. р-р + И/Р + лактат) – группа животных ($n = 14$), которым на протяжении 10 дней интрагастрально с помощью зонда вводили 0,9 %-ный раствор NaCl в дозе 10 мл/кг 1 раз в сутки с последующей ишемией (30 мин) и реперфузией (120 мин) миокарда, а также через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену 0,5 мл 40 мМоль нейтрализованного раствора молочной кислоты (L-(+)-Lactic acid, $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich, США); 4-я – ГХЕ + ишемия-реперфузия + лактат (ГХЕ + И/Р + лактат) – группа животных ($n = 16$), которым на протяжении 10 дней интрагастрально с помощью зонда вводили 10 %-ный раствор холестерина (Sigma-Aldrich, США) на оливковом масле в дозе 10 мл/кг 1 раз в сутки с последующей ишемией (30 мин) и реперфузией (120 мин) миокарда, а также через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену 0,5 мл 40 мМоль нейтрализованного раствора молочной кислоты (L-(+)-Lactic acid, $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich, США).

Эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными, а также руководствуясь требованиями Европейской конвенции от 18.03.1986 о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [23, 24].

Животные содержались в условиях вивария УО «Белорусский государственный медицинский университет» в соответствии с нормативами индивидуального размещения. Рацион крыс состоял из комбикорма КК-92 / ПХЧ-5, количество которого определялось нормами кормления лабораторных животных [25]. Питьевой режим соответствовал принципу *ad libitum*. Световой

режим соответствовал естественному уровню освещенности в течение суток. Температура воздуха в виварии поддерживалась на уровне 20–25 °С, что находится в пределах термонейтральной зоны для крыс. Относительная влажность воздуха составляла 50–70 %. При выполнении работы особое внимание уделялось шумовому режиму содержания животных, так как высокий уровень шума способствует развитию стресса у крыс. Все манипуляции с животными проводили с 8.00 до 18.00. Формирование экспериментальных групп животных осуществлялось методом случайной выборки.

Транзиторную ГХЕ вызывали путем интрагастрального введения с помощью зонда 10 %-ного раствора холестерина (Sigma-Aldrich, США) на оливковом масле в дозе 10 мл/кг 1 раз в сутки на протяжении 10 дней, крысам без ГХЕ вводили 0,9 %-ный раствор NaCl. Для подтверждения ГХЕ у животных использовали автоматический биохимический анализатор A25 Random Access Analyzer (BioSystems S. A., Испания), с помощью которого определяли содержание триглицеридов (ТГ) и общего холестерина (ОХ) в сыворотке крови. Воспроизведение экспериментальных протоколов выполняли через 24 ч после последнего введения холестерина на оливковом масле либо физиологического раствора.

Острую коронарную недостаточность у крыс воспроизводили по методике, описанной С. Clark с соавт. [26]. Для наркотизации животных использовали тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией поддерживающей дозы 10 мг/кг·ч. Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом при помощи аппарата ИВЛ (Harvard, Великобритания) с частотой дыхания 56–60 в минуту и дыхательным объемом 1,0–1,2 мл/100 г массы тела животного. Наличие проходимости дыхательных путей контролировали по давлению в трахее, нормальным значением которого на вдохе считалось 10–15 мм рт. ст. Температуру тела измеряли в прямой кишке с помощью электротермометра (Harvard, Великобритания) и поддерживали электрогрелкой на уровне $37,0 \pm 0,5$ °С. Грудную клетку наркотизированного животного вскрывали в четвертом межреберном промежутке слева. После периода 15-минутной стабилизации гемодинамики крысам выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей ветви левой коронарной артерии (ЛКА) путем механического ее пережатия при помощи лигатуры. Согласно современным экспериментальным данным, считается, что длительность коронарной окклюзии у крыс, равная 30–40 мин, является достаточной для формирования зоны некроза миокарда, составляющей около 50 % от зоны риска [5, 10]. Окклюзия артерии подтверждалась цианозом ишемизированной области, снижением (на 10–20 мм рт. ст.) артериального давления (АД) и подъемом сегмента ST на электрокардиограмме (ЭКГ). Реперфузия миокарда достигалась снятием лигатуры и подтверждалась исчезновением цианоза и возвращением сегмента ST к изолинии. Длительность реперфузии составляла 120 мин, поскольку, согласно имеющимся литературным данным, указанный интервал времени является достаточным для формирования в миокарде крыс зоны некроза [5, 10].

В ходе экспериментов непрерывно регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении и системное АД, полученные при этом данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Spike 4. Для определения АД крысам канюлировали правую общую сонную артерию. Изучали также следующие показатели гемодинамики: среднее АД ($АД_{ср}$), частоту сердечных сокращений (ЧСС), двойное произведение (ДП). $АД_{ср}$ рассчитывали как $АД_{диастолическое} + 1/3 (АД_{систолическое} - АД_{диастолическое})$, ДП – как $ЧСС \cdot АД_{систолическое} / 100$. Показатели гемодинамики регистрировали непрерывно в течение эксперимента и оценивали в конце 15-минутной стабилизации гемодинамики после вскрытия грудной клетки, в начале 30-минутной окклюзии ЛКА, в начале реперфузии, а также каждые 30 мин в течение реперфузии.

Для оценки антиаритмического эффекта фармакологического ПостК подсчитывали общую длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной острой коронарной окклюзии (фибрилляции желудочков (ФЖ), пароксизмальной желудочковой тахикардии (ПЖТ), парной желудочковой экстрасистолии, желудочковой экстрасистолии по типу бигеминии), а также определяли наличие реперфузионных нарушений сердечного ритма.

Критериями исключения животных из опытов являлись $ЧСС < 300$ уд/мин до начала эксперимента и $АД_{ср} < 60$ мм рт. ст.

Зону риска выявлялі путем введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5 %-ного раствора синьки Эванса (Sigma-Aldrich, США) в конце реперфузии при повторном кратковременном пережатии лигатурой ЛКА. Для идентификации зоны риска в миокарде левого желудочка крыс использовали метод, основанный на определении активности дегидрогеназ [27]. Зону риска определяли как зону, не окрашенную в синий цвет. Затем сердце извлекали и отделяли от него левый желудочек. После замораживания в морозильной камере (при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин) левый желудочек разрезали на 6 поперечных срезов, которые затем взвешивали и сканировали с обеих сторон при помощи сканера Epson.

При помощи компьютерной планиметрии с использованием программы Adobe Photoshop CC 2017 для каждого среза определяли отношение средней площади зоны риска в каждом срезе ($\bar{s}_{\text{риска}}$) к средней площади всего среза ($\bar{s}_{\text{среза}}$). Массу зоны риска в каждом срезе вычисляли по формуле

$$m_{\text{риска}} = \frac{\bar{s}_{\text{риска}} \cdot m_{\text{среза}}}{\bar{s}_{\text{среза}}},$$

где $m_{\text{среза}}$ – масса всего среза, мг.

Для расчета общей зоны риска использовали следующую формулу:

$$\text{Зона}_{\text{риска}} (\%) = \frac{\sum m_{\text{риска}}}{m_{\text{ЛЖ}}} \cdot 100,$$

где $\sum m_{\text{риска}}$ – арифметическая сумма значений масс зон риска всех срезов левого желудочка, мг; $m_{\text{ЛЖ}}$ – масса левого желудочка, мг.

После этого для идентификации зоны некроза срезы помещали в 1 %-ный раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре $37,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была бледно-желтой. После 24-часовой инкубации срезов в 10 %-ном растворе формалина в термостате при температуре $37,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ срезы сканировали повторно для определения соотношения площадей зоны риска и зоны некроза. При помощи компьютерной планиметрии для каждого среза миокарда левого желудочка определяли отношение средней площади зоны некроза в каждом срезе ($\bar{s}_{\text{некроза}}$) к средней площади всего среза ($\bar{s}_{\text{среза}}$). Массу зоны некроза в каждом срезе ($m_{\text{некроза}}$) для каждого отдельного среза вычисляли по формуле

$$m_{\text{некроза}} = \frac{\bar{s}_{\text{некроза}} \cdot m_{\text{среза}}}{\bar{s}_{\text{среза}}}.$$

Для расчета общей зоны некроза в миокарде левого желудочка крыс использовали формулу

$$\text{Зона}_{\text{некроза}} (\%) = \frac{\sum m_{\text{некроза}}}{\sum m_{\text{риска}}} \cdot 100,$$

где $\sum m_{\text{некроза}}$ – арифметическая сумма значений масс зон некроза всех срезов левого желудочка.

Изучение кардиопротекторной эффективности лактата при ишемии-реперфузии миокарда у крыс (в группах Физ. р-р + И/Р + лактат и ГХЕ + И/Р + лактат) проводилось у животных, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену 0,5 мл 40 мМоль нейтрализованного раствора молочной кислоты (L-(+)-Lactic acid, $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich, США), т. е. в дозе 10 мг/кг. Нейтрализованный лактат получали путем растворения молочной кислоты в 0,9 %-ном растворе NaCl для инъекций с последующим доведением pH до 7,4 с помощью NaOH (10 N).

Доза лактата (10 мг/кг) была выбрана нами с целью обеспечить уровень лактата в крови, близкий к тому, что имел место после 15-минутной окклюзии обеих бедренных артерий [19, 20].

Уровень лактата в цельной крови, взятой из левой общей яремной вены, определяли при помощи анализатора Lactate Pro 2 (Arkray, Япония) малообъемным методом (0,3 мкл крови) с ис-

пользованием тест-полосок для биохимических исследований (Lactate Pro 2 Test Strip, Arkray, Япония).

Полученные результаты анализировали с использованием стандартных пакетов статистических программ Statistica 13.3 и GraphPad Prism. Для оценки нормальности распределения анализируемых показателей применяли критерий Колмогорова–Смирнова. Статистическую значимость различий полученных данных в случае их параметрического распределения оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием тестов множественных сравнений Данна и Бонферрони. Результаты исследования при их параметрическом распределении представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Для оценки статистической значимости различий данных в случае их непараметрического распределения использовали критерий Краскала–Уоллиса и тест множественных сравнений Данна. При непараметрическом распределении результаты исследования были представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й; 75-й процентиля). Уровень $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимый.

Результаты и их обсуждение. Выживаемость крыс после острой коронарной окклюзии составила 80,0 % (11 крыс из 55 погибли в период острой ишемии миокарда и реперфузии). При этом в группе Физ. р-р + И/Р выживаемость животных составила 83,3 %; в группе ГХЕ + И/Р – 76,9; в группе Физ. р-р + И/Р + лактат – 85,7; а в группе ГХЕ + И/Р + лактат – 75,0 %. Таким образом, количество животных в экспериментальных группах с учетом их выживаемости стало следующим: Физ. р-р + И/Р – 10 крыс, ГХЕ + И/Р – 10, Физ. р-р + И/Р + лактат – 12, ГХЕ + И/Р + лактат – 12 крыс.

У крыс с ГХЕ содержание ТГ в сыворотке крови составило $1,55 \pm 0,11$ ммоль/л ($p < 0,01$), ОХ – $5,91 \pm 0,41$ ммоль/л ($p < 0,01$). У крыс без ГХЕ содержание ТГ составило $0,25 \pm 0,05$ ммоль/л, ОХ – $2,76 \pm 0,06$ ммоль/л. Таким образом, у крыс с ГХЕ имело место статистически значимое повышение содержания в сыворотке крови ТГ (в 6,2 раза) и ОХ (в 2,1) раза по сравнению с их содержанием у крыс без ГХЕ ($p < 0,01$).

У животных в группах Физ. р-р + И/Р и ГХЕ + И/Р статистически значимых отличий АД_{ср} и ЧСС на протяжении эксперимента по сравнению с их исходными значениями не выявлено. У крыс, которым через 25 мин после начала реперфузии осуществлялось внутривенное введение раствора лактата в дозе 10 мг/кг (Физ. р-р + И/Р + лактат и ГХЕ + И/Р + лактат), статистически значимых отличий АД_{ср} и ЧСС на протяжении эксперимента по сравнению с исходными значениями также не выявлено (см. таблицу).

При проведении исследования установлено, что величина ДП в анализируемых группах крыс до начала острой коронарной окклюзии статистически значимо не различалась. Кроме того, на протяжении эксперимента во всех экспериментальных группах крыс отличий ДП от своих исходных значений также не выявлено ($p > 0,05$). Следовательно, были основания полагать, что животные всех анализируемых групп до начала эксперимента характеризовались сходной потребностью миокарда в кислороде.

При изучении антиаритмической эффективности фармакологического ПостК с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда были получены следующие результаты продолжительности аритмий в исследуемых группах: Физ. р-р + И/Р – 182 (25; 240); ГХЕ + И/Р – 259 (107; 379); Физ. р-р + И/Р + лактат – 76 (27; 152); ГХЕ + И/Р + лактат – 105 (66; 192) (рис. 1).

В ходе исследования также установлено, что в группе Физ. р-р + И/Р у 7 из 10 крыс отмечалась ФЖ, а у 9 животных данной группы была выявлена ПЖТ. Реперфузионные нарушения сердечного ритма имели место у 8 крыс данной группы. В группе ГХЕ + И/Р в период острой коронарной окклюзии у 10 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а ПЖТ имела место у 11 крыс. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались у 11 животных данной группы. В группе Физ. р-р + И/Р + лактат в период 30-минутной ишемии миокарда ФЖ и ПЖТ были выявлены у 10 из 12 крыс. Реперфузионные аритмии имели место у 7 животных группы Физ. р-р + И/Р + лактат. В группе ГХЕ + И/Р + лактат в период острой коронарной окклюзии у 9 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а ПЖТ имела место у 10 крыс. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались у 8 животных данной группы.

Изменение показателей гемодинамики на протяжении эксперимента у крыс в исследуемых группах
Changes in the hemodynamic parameters in the rat experiment in the study groups

Показатели гемодинамики		Контроль (И/Р)		Опыт (И/Р + лактат)	
		Группа с ГХЕ (n = 10)	Группа с физ. р-ром (n = 10)	Группа с ГХЕ (n = 12)	Группа с физ. р-ром (n = 12)
До начала ОИМ	АД _{ср}	81 ± 4	84 ± 5	80 ± 4	82 ± 3
	ЧСС	414 ± 17	410 ± 12	416 ± 16	410 ± 15
Начало ОИМ	АД _{ср}	71 ± 3	73 ± 4	68 ± 5	69 ± 4
	ЧСС	433 ± 11	429 ± 7	437 ± 19	434 ± 16
Начало реперфузии	АД _{ср}	76 ± 5	77 ± 5	74 ± 3	76 ± 4
	ЧСС	436 ± 25	426 ± 18	441 ± 18	420 ± 23
30' реперфузии	АД _{ср}	78 ± 4	77 ± 5	73 ± 4	75 ± 4
	ЧСС	440 ± 18	427 ± 16	445 ± 19	424 ± 21
60' реперфузии	АД _{ср}	76 ± 6	76 ± 4	75 ± 5	78 ± 5
	ЧСС	433 ± 13	423 ± 14	434 ± 24	415 ± 21
90' реперфузии	АД _{ср}	79 ± 5	75 ± 4	77 ± 5	78 ± 4
	ЧСС	422 ± 15	434 ± 16	436 ± 25	417 ± 18
120' реперфузии	АД _{ср}	80 ± 6	82 ± 5	79 ± 4	80 ± 3
	ЧСС	418 ± 14	419 ± 19	431 ± 21	420 ± 17

Таким образом, длительность ишемических нарушений сердечного ритма в исследуемых группах с фармакологическим ПостК при помощи лактата сопоставима с таковой в группах контроля, что вполне объяснимо, учитывая то, что фармакологическое ПостК и введение животным через 25 мин от начала реперфузии нейтрализованного лактата не могли оказывать влияние на выраженность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной ОИМ. Тем не менее, в группах фармакологического ПостК с помощью лактата отмечалась тенденция к снижению частоты встречаемости реперфузионных нарушений ритма и общей длительности нарушений сердечного ритма по сравнению с аналогичными показателями в контрольных группах без применения лактата.

При изучении инфаркт-лимитирующего эффекта фармакологического ПостК при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с транзиторной ГХЕ статистически значимых различий между анализируемыми группами по показателю размера зоны риска в миокарде левого желудочка

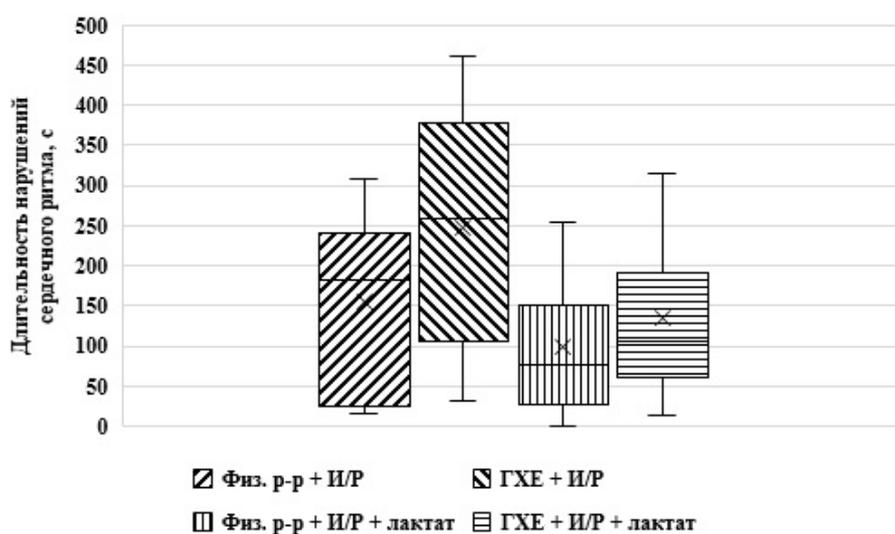


Рис. 1. Длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной ишемии и 120-минутной реперфузии миокарда у крыс в исследуемых группах

Fig. 1. Duration of cardiac arrhythmias for 30-minute ischemia and 120-minute myocardial reperfusion in rats in the study groups

не выявлено. Так, ишемическая зона в группе Физ. р-р + И/Р составила 54 ± 2 %, в группе ГХЕ + И/Р – 55 ± 4 , в группе Физ. р-р + И/Р + лактат – 52 ± 3 , в группе ГХЕ + И/Р + лактат – 53 ± 4 %. Таким образом, во всех анализируемых группах размеры зоны риска в миокарде левого желудочка были сопоставимы.

Размер инфаркта является важным показателем повреждения миокарда из-за его влияния на сократимость сердца. Установлено, что размер зоны некроза в миокарде левого желудочка у животных в группе Физ. р-р + И/Р составил 45 ± 4 %, а в группе ГХЕ + И/Р – 43 ± 4 %. После внутривенного введения животным лактата (10 мг/кг), которое осуществлялось через 25 мин после начала реперфузии, у крыс при ишемии и реперфузии миокарда в левом желудочке формировались следующие размеры зон некроза: в группе Физ. р-р + И/Р + лактат – 32 ± 3 % ($p < 0,05$), а в группе ГХЕ + И/Р + лактат – 42 ± 5 % (рис. 2).

Следовательно, полученные данные свидетельствуют об отсутствии инфаркт-лимитирующего эффекта фармакологического ПостК с помощью лактата у крыс с ГХЕ. У крыс без ГХЕ, напротив, воспроизводится выраженный инфаркт-лимитирующий эффект фармакологического ПостК с помощью лактата.

Согласно современным представлениям, размер очага некроза в миокарде зависит от множества факторов, в частности от длительности ишемии миокарда, состояния сосудистого русла, размера зоны риска, температуры тела, наличия сопутствующих заболеваний и нарушения обмена веществ, в частности липидного обмена. В исследовании длительность ишемии миокарда и температура тела животных имели одинаковые значения во всех экспериментальных группах. Учитывая непродолжительный период (10 дней) экспериментального моделирования транзиторной ГХЕ, маловероятно, что в стенке кровеносных сосудов крыс с ГХЕ произошли значимые морфологические изменения, связанные с вызванным нарушением липидного обмена. Кроме того, согласно литературным данным, потребление крысами богатой холестерином пищи в течение длительного периода времени не приводит к развитию атеросклеротических изменений в сосудах [28].

Многочисленные экспериментальные исследования посвящены выявлению возможных причин отсутствия противоишемического эффекта ПостК у экспериментальных животных с ГХЕ. При этом большинство авторов указывают на повреждение различных компонентов RISK-киназного пути (The Reperfusion Injury Salvage Kinase), который инициируется при стимуляции рецепторов, связанных с G-белком (GPCRs) и имеет важное значение в реализации кардиопротекторных эффектов ПостК. В частности, отсутствие инфаркт-лимитирующего эффекта ПостК

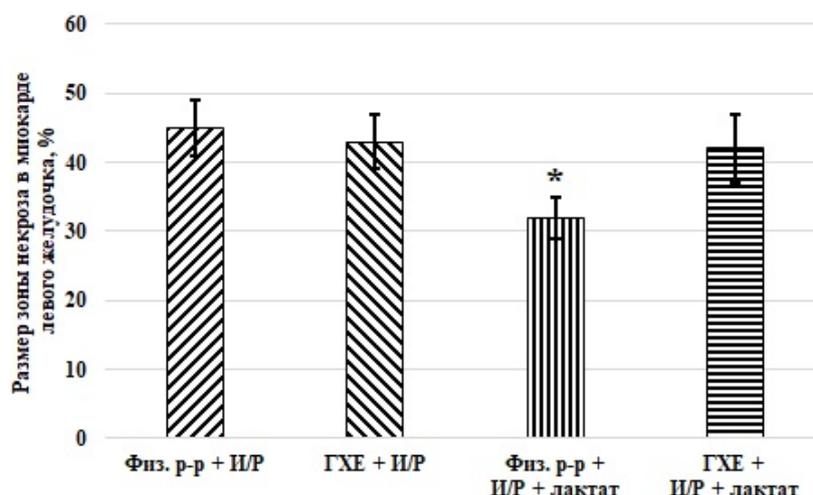


Рис. 2. Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка в исследуемых группах.

* – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) размеров зоны некроза в группе Физ. р-р + И/Р + лактат по сравнению с другими исследуемыми группами

Fig. 2. Necrosis area sizes in the left ventricular myocardium in the study groups.

* – statistically significant differences ($p < 0.05$) in the necrosis area size in the group Phys. solution + I/R + lactate in comparison to other study groups

у животных с экспериментальной моделью ГХЕ сопровождается существенным снижением фосфорилирования киназы гликоген-синтазы 3β [29, 30], а также Akt (протеинкиназа B), ERK (Extracellular signal-regulated kinases), p70 рибосомальной S6 киназы (p70S6K) [31]. В то же время уровень фосфорилирования данных киназ у животных с нормальным уровнем холестерина в сыворотке крови был существенно выше, чем у животных с ГХЕ.

Кроме того, в исследовании M. Sack с соавт. (2011) установлено, что в условиях ГХЕ у экспериментальных животных отсутствие инфаркт-лимитирующего эффекта при ишемии-реперфузии миокарда может быть связано с нарушением синтеза монооксида азота (NO), который также имеет важное значение в реализации кардиопротекторных эффектов ПостК [32]. В частности, при ГХЕ нарастающая митохондриальная дисфункция приводит к повышению оксидации тетрагидробиоптерина (ТГБП), что приводит к снижению его содержания в клетке. Потеря ТГБП как молекулы-кофактора эндотелиальной NO-синтазы приводит к значительному снижению активности данного фермента.

Таким образом, принимая во внимание имеющиеся литературные данные, можно предположить, что повреждение RISK-киназного пути и нарушение синтеза NO у животных с ГХЕ объясняется отсутствием инфаркт-лимитирующего эффекта фармакологического ПостК с помощью лактата у крыс с экспериментальной моделью транзиторной ГХЕ.

Заключение. Установлено, что ДИПостК при ишемии-реперфузии миокарда приводит к повышению уровня лактата в крови крыс, оказывая инфаркт-лимитирующий эффект. Выявлено, что введение в кровоток животным лактата в дозе 10 мг/кг через 25 мин после начала реперфузии, как и при ДИПостК, приводит к уменьшению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка. Это дает основание полагать, что повышенный уровень молочной кислоты в крови инициирует кардиопротекторный эффект ДИПостК. Фармакологическое посткондиционирование с помощью лактата не эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка крыс с транзиторной гиперхолестеринемией. Наличие такого фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний, как гиперхолестеринемия, может служить критерием для исключения применения фармакологического посткондиционирования с помощью лактата в качестве способа уменьшения ишемических и реперфузионных повреждений миокарда у пациентов с острым инфарктом миокарда.

Полученные знания о биохимических механизмах кардиопротекторной эффективности дистантного ишемического посткондиционирования послужат научным обоснованием для разработки новых подходов к профилактике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний, патогенез которых связан с недостаточным кровоснабжением миокарда и тканевой гипоксией.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Сердечно-сосудистые заболевания в Республике Беларусь: анализ ситуации и стратегии контроля / А. Г. Мрочек [и др.]. – Минск : Беларус. навука. – 2011. – 340 с.
2. Эволюционные аспекты кардиопротекции / И. В. Шемарова [и др.] // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 2018. – Т. 54, № 1. – С. 9–19.
3. Кардиопротективные эффекты ишемического кондиционирования: современные представления о механизмах, экспериментальные подтверждения, клиническая реализация / А. Е. Баутин [и др.] // Трансляц. медицина. – 2016. – Т. 3, № 1. – С. 50–62.
4. Адаптивный феномен ишемического посткондиционирования сердца. Перспективы клинического применения / Л. Н. Маслов [и др.] // Вестн. Рос. акад. мед. наук. – 2013. – Т. 68, № 1. – С. 10–20.
5. Шляхто, Е. В. Ограничение ишемического и реперфузионного повреждения миокарда с помощью пре- и посткондиционирования: молекулярные механизмы и мишени для фармакотерапии / Е. В. Шляхто, Е. М. Нифонтов, М. М. Галагудза // Креатив. кардиология. – 2007. – № 1–2. – С. 75–101.
6. Heusch, G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning / G. Heusch // Circ. Res. – 2015. – Vol. 116, N 4. – P. 674–699. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305348>
7. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning / Z.-Q. Zhao [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 285, N 2. – P. H579–H588. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002>
8. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning / P. Ferdinandy [et al.] // Pharmacol. Rev. – 2014. – Vol. 66, N 4. – P. 1142–1174. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008300>

9. Reduction of myocardial ischaemia-reperfusion injury with pre- and postconditioning: molecular mechanisms and therapeutic targets / M. M. Galagudza [et al.] // *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* – 2008. – Vol. 8, N 1. – P. 47–65. <https://doi.org/10.2174/187152908783884966>
10. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms / M. Basalay [et al.] // *Exp. Physiol.* – 2012. – Vol. 97, N 8. – P. 908–917. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.064923>
11. Кардиопротекторная эффективность дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у старых крыс / Ф. И. Висмонт [и др.] // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : сб. рецензир. науч. работ / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. А. В. Сикорского, О. К. Дорониной. – Минск, 2017. – Вып. 7. – С. 181–186.
12. Donato, M. Protecting the heart from ischemia/reperfusion injury: an update on remote ischemic preconditioning and postconditioning / M. Donato, P. Evelson, R. J. Gelpi // *Curr. Opin. Cardiol.* – 2017. – Vol. 32, N 6. – P. 784–790. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000447>
13. Висмонт, Ф. И. Периферические М-холинореактивные системы в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда в эксперименте / Ф. И. Висмонт, С. Н. Чепелев, П. Ф. Юшкевич // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2019. – Т. 16, № 4. – С. 424–433.
14. Nitric oxide-mediated relaxation to lactate of coronary circulation in the isolated perfused rat heart / J. J. Montoya [et al.] // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 58, N 4. – P. 392–398. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318226bcf7>
15. Чепелев, С. Н. О значимости монооксида азота в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс / С. Н. Чепелев, Ф. И. Висмонт // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2020. – Т. 17, № 3. – С. 353–364.
16. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study / C. Groussard [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol. 89, N 1. – P. 169–175. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.169>
17. Ichai, C. Lactate and acute heart failure syndrome: in the book acute heart failure / C. Ichai, X. Leverve, J. C. Orban // *Acute Heart Failure / A. Mebazaa, M. Gheorghide, F. M. Zannad, J. E. Parrillo (eds).* – London : Springer, 2008. – P. 768–780.
18. Клинические аспекты динамики лактата крови во время операции на сердце и аорте в условиях искусственного кровообращения / Н. А. Трекова [и др.] // *Анестезиология и реанимация.* – 2016. – Т. 61, №5. – С. 324–329.
19. Чепелев, С. Н. О значимости гиперлактатемии в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда в эксперименте / С. Н. Чепелев, Ф. И. Висмонт, С. В. Губкин // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 332–340.
20. Чепелев, С. Н. Инфаркт-лимитирующий эффект фармакологического посткондиционирования с помощью молочной кислоты у крыс и значимость монооксида азота в механизмах его реализации / С. Н. Чепелев, Ф. И. Висмонт, С. В. Губкин // *Новости мед.-биол. наук.* – Т. 20, № 2. – С. 55–62.
21. Липовецкий, Б. М. Дислипидемии, атеросклероз и их связь с ишемической болезнью сердца и мозга: рук. для врачей и студентов-медиков / Б. М. Липовецкий. – СПб. : Эко-Вектор, 2012. – 75 с.
22. Effect of hypercholesterolaemia on myocardial function, ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning / I. Andreadou [et al.] // *Brit. J. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 174, N 12. – P. 1555–1569. <https://doi.org/10.1111/bph.13704>
23. 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 [Electronic resource]. – Mode of access: www.eur-lex.europa.eu. – Date of access: 10.01.2021.
24. Технический кодекс установившейся практики 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденный постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008 г. – Минск, 2008. – 35 с.
25. О нормах кормления лабораторных животных и продуцентов : приказ М-ва здравоохранения СССР от 10 марта 1966 г. № 163 // *Правовая Россия [Электронный ресурс].* – Режим доступа: <http://lawru.info/dok/1966/03/10/n1190735.htm>. – Дата доступа: 10.01.2021.
26. Coronary artery ligation in anesthetized rats as a method for the production of experimental dysrhythmias and for the determination of infarct size / C. Clark [et al.] // *J. Pharmacol Methods.* – 1980. – Vol. 3, N 4. – P. 357–368. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(80\)90077-7](https://doi.org/10.1016/0160-5402(80)90077-7)
27. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique / M. C. Fishbein [et al.] // *Am. Heart J.* – 1981. – Vol. 101, N 5. – P. 593–600. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(81\)90226-x](https://doi.org/10.1016/0002-8703(81)90226-x)
28. Ferdinandy, P. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning and postconditioning / P. Ferdinandy, R. Schulz, G. Baxter // *Pharmacol. Rev.* – 2007. – Vol. 59, N 4. – P. 418–458. <https://doi.org/10.1124/pr.107.06002>
29. Hypercholesterolemia abrogates the cardioprotection of ischemic postconditioning in isolated rat heart: roles of glycogen synthase kinase-3 β and the mitochondrial permeability transition pore / N. Wu [et al.] // *Cell. Biochem. Biophys.* – 2014. – Vol. 69, N 1. – P. 123–130. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9778-2>
30. Regular treadmill exercise restores cardioprotective signaling pathways in obese mice independently from improvement in associated co-morbidities / S. Pons [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2013. – Vol. 54. – P. 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.010>
31. High cholesterol diet effects on ischemia-reperfusion injury of the heart / V. D'Annunzio [et al.] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 90, N 9. – P. 1185–1196. <https://doi.org/10.1139/y2012-085>
32. Sack, M. The role of comorbidities in cardioprotection / M. Sack, E. Murphy // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 16, N 3–4. – P. 267–272. <https://doi.org/10.1177/1074248411408313>

References

1. Mrochek A. G., Grakovich A. A., Kozlov I. D., Gorbachev V. V. *Cardiovascular diseases in the Republic of Belarus: the analysis of the situation and control strategy*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 340 p. (in Russian).
2. Shemarova I. V., Nesterov V. P., Korotkov S. M., Silkin Yu. A. Evolutionary aspects of cardioprotection. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii* [Journal of evolutionary biochemistry and physiology], 2018, vol. 54, no. 1, pp. 9–19 (in Russian).
3. Bautin A. E., Karpova L. I., Marichev A. O., Tashkhanov D. M., Naumenko V. S., Galagudza M. M. Cardioprotective effects of ischemic conditioning: current concepts of mechanisms, experimental evidence, clinical implementation. *Translyatsionnaya meditsina* [Translational medicine], 2016, vol. 3, no. 1, pp. 50–62 (in Russian).
4. Maslov L. N., Mrochek A. G., Khaliulin I. G., Khanush L., Pei Zh. M., Zhang I. Adaptive phenomenon of ischemic postconditioning of the heart. Perspectives of clinical use. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, vol. 68, no. 1, pp. 10–20 (in Russian).
5. Shlyakhto E. V., Nifontov E. M., Galagudza M. M. Limitation of ischemic and reperfusion injury of the myocardium using pre- and postconditioning: molecular mechanisms and targets for pharmacotherapy. *Kreativnaya kardiologiya = Creative cardiology*, 2007, no. 1–2, pp. 75–101 (in Russian).
6. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre, post, and remote conditioning. *Circulation Research*, 2015, vol. 116, no. 4, pp. 674–699. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305348>
7. Zhao Z.-Q., Corvera J. S., Halcos M. E., Kerendi F., Wang N. P., Guyton R. A., Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 2003, vol. 285, no. 2, pp. H579–H588. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002>
8. Ferdinandy P., Hausenloy D. J., Heusch G., Baxter G. F., Schulz R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacological Reviews*, 2014, vol. 66, no. 4, pp. 1142–1174. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008300>
9. Galagudza M. M., Blokhin I. O., Shmonin A. A., Mischenko K. A. Reduction of myocardial ischaemia-reperfusion injury with pre- and postconditioning: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cardiovascular and Hematological Disorders-Drug Targets*, 2008, vol. 8, no. 1, pp. 47–65. <https://doi.org/10.2174/187152908783884966>
10. Basalay M., Barsukevich V., Mastitskaya S., Mrochek A., Pernow J., Sjöquist P. O., Ackland G. L., Gourine A. V., Gourine A. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Experimental Physiology*, 2012, vol. 97, no. 8, pp. 908–917. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.064923>
11. Vismont F. I., Chepelev S. N., Glebov A. N., Yushkevich P. F. Cardioprotective efficiency of remote ischemic postconditioning during ischemia-reperfusion in old rats. *BGMU v avangarde meditsinskoi nauki i praktiki. Sbornik retsenziruemykh nauchnykh rabot. Vypusk 7* [BSMU at the forefront of medical science and practice: a collection of peer-reviewed scientific papers. Iss. 7]. Minsk, 2017, pp. 181–186 (in Russian).
12. Donato M., Evelson P., Gelpi R. J. Protecting the heart from ischemia/reperfusion injury: an update on remote ischemic preconditioning and postconditioning. *Current Opinion in Cardiology*, 2017, vol. 32, no. 6, pp. 784–790. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000447>
13. Vismont F. I., Chepelev S. N., Yushkevich P. F. Peripheral M-choline-reactive systems in the infarct-limited effect implementation of remote ischemic postconditioning during ischemia-reperfusion of myocardium in experiment. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*, 2019, vol. 16, no. 4, pp. 424–433 (in Russian).
14. Montoya J. J., Fernández N., Monge L., Diéguez G., Villalón A. L. Nitric oxide-mediated relaxation to lactate of coronary circulation in the isolated perfused rat heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2011, vol. 58, no. 4, pp. 392–398. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318226bcf7>
15. Chepelev S. N., Vismont F. I. Significance of nitrogen monoxide in the implementation of the infarct-limiting effect of remote ischemic postconditioning in myocardial ischemia-reperfusion in young and old rats. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya meditsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*, 2020, vol. 17, no. 3, pp. 353–364. (in Russian).
16. Groussard C., Morel I., Chevanne M., Monnier M., Cillard J., Delamarche A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *Journal of Applied Physiology*, 2000, vol. 89, no. 1, pp. 169–175. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.169>
17. Ichai C., Leverve X., Orban J. C. Lactate and acute heart failure syndrome. *Acute Heart Failure*. London, 2008, pp. 768–780.
18. Trekova N. A., Aksel'rod B. A., Yudichev I. I., Gus'kov D. A., Markin A. V., Popov A. M. Clinical aspects of the dynamics of blood lactate during surgery on the heart and aorta under conditions of cardiopulmonary bypass. *Anesteziologiya i reanimatologiya = Anesthesia and resuscitation*, 2016, vol. 61, no. 5, pp. 324–329.
19. Chepelev S. N., Vismont F. I., Gubkin S. V. On the significance of hyperlactatemia in the implementation of the infarct-limiting effect of remote ischemic postconditioning in myocardial ischemia-reperfusion in the experiment. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 3, pp. 332–340 (in Russian).
20. Chepelev S. N., Vismont F. I., Gubkin S. V. Infarct-limiting effect of pharmacological postconditioning using lactic acid in rats and the significance of nitrogen monoxide in mechanisms of its realization. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2020, vol. 20, no. 2, pp. 55–62.
21. Lipovetskii B. M. *Dyslipidemias, atherosclerosis and their relationship with ischemic heart and brain disease: manual for doctors and medical students*. St. Petersburg, Eko-Vektor Publ., 2012, 75 p.

22. Andreadou I., Iliodromitis E. K., Lazou A., Görbe A., Giricz Z., Schulz R., Ferdinandy P. Effect of hypercholesterolemia on myocardial function, ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *British Journal of Pharmacology*, 2017, vol. 174, no. 12, pp. 1555–1569. <https://doi.org/10.1111/bph.13704>

23. 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. Available at: <http://www.eur-lex.europa.eu> (accessed 10.01.2021).

24. *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).

25. On the norms of feeding laboratory animals and producers: order of the USSR Ministry of Health on March 10, 1966 N 163. *Legal Russia*. Available at: <http://lawru.info/dok/1966/03/10/n1190735.htm> (accessed 10.01.2021) (in Russian).

26. Clark C., Foreman M. I., Kane K. A., McDonald F. M., Parratt J. R. Coronary artery ligation in anesthetized rats as a method for the production of experimental dysrhythmias and for the determination of infarct size. *Journal of Pharmacological Methods*, 1980, vol. 3, no. 4, pp. 357–368. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(80\)90077-7](https://doi.org/10.1016/0160-5402(80)90077-7)

27. Fishbein M. C., Meerbaum S., Rit J., Lando U., Kanmatsuse K., Mercier J. C., Corday E., Ganz W. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *American Heart Journal*, 1981, vol. 101, no. 5, pp. 593–600. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(81\)90226-x](https://doi.org/10.1016/0002-8703(81)90226-x)

28. Ferdinandy P., Schulz R., Baxter G. F. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning and postconditioning. *Pharmacological Reviews*, 2007, vol. 59, no. 4, pp. 418–458. <https://doi.org/10.1124/pr.107.06002>

29. Wu N., Zhang X., Guan Y., Shu W., Jia P., Jia D. Hypercholesterolemia abrogates the cardioprotection of ischemic postconditioning in isolated rat heart: roles of glycogen synthase kinase-3 β and the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014, vol. 69, no. 1, pp. 123–130. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9778-2>

30. Pons S., Martin V., Portal L., Zini R., Morin D., Berdeaux A., Ghaleh B. Regular treadmill exercise restores cardioprotective signaling pathways in obese mice independently from improvement in associated co-morbidities. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2013, vol. 54, pp. 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.010>

31. D'Annunzio V., Donato M., Buchholz B., Perez V., Miksztowicz V., Berg G., Gelpi R. J. High cholesterol diet effects on ischemia-reperfusion injury of the heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2012, vol. 90, no. 9, pp. 1185–1196. <https://doi.org/10.1139/y2012-085>

32. Sack M., Murphy E. The role of comorbidities in cardioprotection. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2011, vol. 16, no. 3–4, pp. 267–272. <https://doi.org/10.1177/1074248411408313>

Информация об авторах

Чепелев Сергей Николаевич – ст. преподаватель. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: drserge1991@gmail.com

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

Губкин Сергей Владимирович – д-р мед. наук, профессор, директор. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: goubkin@yandex.ru

Маслов Леонид Николаевич – д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории. Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (ул. Киевская, 111А, 634012, г. Томск, Российская Федерация). E-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

Information about the authors

Sergey N. Chepelev – Senior Lecturer. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: drserge1991@gmail.com

Frantisek 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

Sergey V. Goubkin – D. Sc. (Med.), Professor, Director. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: goubkin@yandex.ru

Leonid N. Maslov – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (111A, Kievskaya Str., 634012, Tomsk, Russian Federation). E-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.12-009.72-085.273.55-036.8:[575.174.015.3:612.111.7](476.6)

Поступила в редакцию 09.09.2020

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-147-159>

Received 09.09.2020

**Т. П. Пронько, В. А. Снежицкий, О. В. Горчакова,
Т. Л. Степура, М. Л. Гладкий**

*Гродненский государственный медицинский университет,
Гродно, Республика Беларусь*

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ТРОМБОЦИТАРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ
P2RY12, *ITGB3* И ФЕРМЕНТА-МЕТАБОЛИЗАТОРА ЦИТОХРОМА *CYP2C19*
НА АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛОПИДОГРЕЛА
У ПАЦИЕНТОВ СО СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИЕЙ НАПРЯЖЕНИЯ,
ПРОЖИВАЮЩИХ В ГРОДНЕНСКОМ РЕГИОНЕ**

Аннотация. Цель исследования – оценка распространения полиморфных вариантов G681A гена *CYP2C19*, H1/H2 гена *P2RY12*, T1565C гена *ITGB3* и изучение их влияния на активность тромбоцитов и эффективность клопидогрела у пациентов со стабильной стенокардией напряжения (ССН), проживающих в Гродненском регионе. В исследование было включено 92 пациента с ССН, 89 из которых подверглись процедуре планового чрескожного коронарного вмешательства, и 93 практически здоровых человека. Данные обследований (общеклинических, агрегометрии, общего анализа крови и тромбоцитарных индексов, генотипирования методом полимеразной цепной реакции) проанализированы с использованием программы STATISTICA 10.0.

В выборке лиц Гродненского региона выявлена высокая распространенность носительства генотипов, ассоциированных с возможной вариабельностью ответа на терапию клопидогрелем, как среди пациентов со стабильной стенокардией, так и среди практически здоровых лиц. Частота встречаемости указанных генотипов среди пациентов со стабильной стенокардией составила 23,9 % для гена *CYP2C19* (полиморфный локус G681A), 40,2 % для гена *P2RY12* (полиморфный локус H1/H2), 31,5 % для гена *ITGB3* (полиморфный локус T1565C), среди практически здоровых лиц – 18,3; 46,2; 37,6 % соответственно. Выявлены ассоциации между носительством аллеля 681A гена *CYP2C19* и гаплотипа H2 гена *P2RY12* и высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне терапии клопидогрелем у пациентов с ССН. Обнаружена ассоциация между носительством гаплотипа H2 полиморфизма H1/H2 гена *P2RY12* с высокими значениями MPV тромбоцитов и более высокой частотой встречаемости крупных тромбоцитов (P-LCR) у пациентов с ССН.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, тромбоцитарные индексы, клопидогрел, полиморфизм генов, стабильная стенокардия

Для цитирования: Влияние полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов *P2RY12*, *ITGB3* и фермента-метаболизатора цитохрома *CYP2C19* на активность тромбоцитов и эффективность клопидогрела у пациентов со стабильной стенокардией напряжения, проживающих в Гродненском регионе / Т. П. Пронько [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 147–159. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-147-159>

**Tatyana P. Pronko, Viktor A. Snezhitskiy, Olga V. Gorchakova,
Tatyana L. Stepuro, Maxim L. Gladkiy**

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

**EFFECT OF POLYMORPHISM OF PLATELET RECEPTOR GENES *P2RY12*, *ITGB3*
AND *CYP2C19* CYTOCHROME METABOLIZER ENZYME ON THE PLATELET ACTIVITY
AND EFFICIENCY OF CLOPIDOGREL IN PATIENTS WITH STABLE STENOCARDIA
IN THE GRODNO REGION**

Abstract. The aim of the study was to assess the distribution of polymorphic variants G681A of the *CYP2C19* gene, H1/H2 of the *P2RY12* gene, and T1565C of the *ITGB3* gene and to study their effect on the platelet activity and clopidogrel efficacy in patients with stable stenocardia living in the Grodno region. The study included 92 patients with stable stenocardia, 89 of them underwent elective percutaneous coronary intervention (PCI), and 93 practically healthy people. The survey data (general clinical, aggregometry, general blood count and platelet indices, and polymerase chain reaction genotyping) were analyzed using the STATISTICA 10.0 software.

A high prevalence of carriage of genotypes associated with possible variability in response to clopidogrel therapy was revealed both among patients with stable stenocardia and among practically healthy individuals in the Grodno region. The frequency of occurrence of studying genotypes among patients with stable stanocardia was 23.9 % for the *CYP2C19* gene (polymorphic locus G681A), 40.2 % for the *P2RY12* gene (polymorphic locus H1/H2), and 31.5 % for the gene *ITGB3* (polymorphic

locus T1565C). For the group of practically healthy individuals, the distribution of these genotypes was 18.3; 46.2; 37.6 %, respectively. Associations were revealed between the carriage of the 681A allele of the *CYP2C19* gene and the H2 haplotype of the *P2RY12* gene with high residual platelet reactivity during clopidogrel therapy in patients with stable stenocardia. An association was found between the carriage of the H2 haplotype of the H1/H2 polymorphism of the *P2RY12* gene with high platelet MPV values and a higher frequency of large platelets (P-LCR) in patients with stable stenocardia.

Keywords: platelet aggregation, platelet indices, clopidogrel, gene polymorphism, stable stenocardia

For citation: Pronko T. P., Snezhitskiy V. A., Gorchakova O. V., Stepuro T. L., Gladkiy M. L. Effect of polymorphism of platelet receptors genes *P2RY12*, *ITGB3* and *CYP2C19* cytochrome metabolizer enzyme on the platelet activity and efficiency of clopidogrel in patients with stable stenocardia in the Grodno region. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 147–159 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-147-159>

Введение. Двойная антитромбоцитарная терапия (ДАТТ) является основополагающей для снижения риска развития сердечно-сосудистых событий у лиц с острым коронарным синдромом и у пациентов при плановых чрескожных коронарных вмешательствах (ЧКВ). ДАТТ состоит из комбинации ацетилсалициловой кислоты (АСК) и блокатора рецепторов аденозиндифосфата (АДФ) P2RY12 тромбоцитов – клопидогрела. При этом фармакологический ответ на клопидогрел отличается значительной вариабельностью – до 30 % пациентов могут быть резистентными к данному препарату, что ассоциировано с высоким риском смерти, инфаркта миокарда или инсультов [1]. Механизмы резистентности к действию клопидогрела многогранны и обусловлены сочетанием биологических, клинических, генетических и фармакологических факторов, оказывающих влияние на функциональную активность тромбоцитов [1, 2].

Клопидогрел является пролекарством. После всасывания до 85 % препарата превращается в неактивный метаболит, а оставшиеся 15 % подвергаются двухступенчатой биоактивации в печени. При этом на обоих этапах образования активного метаболита основную роль играет изофермент CYP2C19 [3]. Полиморфизм G681A гена *CYP2C19*, а именно наличие аллеля 681A, ассоциирован с низкой ферментативной активностью изофермента, что ведет к уменьшению антиагрегантного эффекта клопидогрела [3]. Различают быстрые метаболитаторы клопидогрела – носители генотипа GG, промежуточные метаболитаторы – носители генотипа GA и медленные метаболитаторы – носители генотипа AA [3].

Еще одним из факторов, способных определять эффективность клопидогрела, может быть генетически детерминированная особенность рецепторов тромбоцитов. Тромбоцитарные рецепторы АДФ – P2Y1 и P2Y12 играют большую роль в функционировании, активации и необратимой агрегации тромбоцитов и являются терапевтической мишенью клопидогрела [4]. В гене *P2Y12* было выявлено 4 мутации: 3 из них вызывают замены нуклеотидов (C139T, T744C, G52T) и одна приводит к вставке аденозина в соответствующих позициях (ins801A). Все 4 варианта полиморфизма наследуются сцеплено и обуславливают формирование двух гаплотипов – H1 (C139, T744, G52 и отсутствие вставки) и H2 (139T, 744C, 52T, ins801A) [5]. Гаплотип H2 ассоциируется с гиперактивностью тромбоцитов как у здоровых лиц, так и у пациентов с атеросклерозом, с повышенным риском атеротромбоза, а также с ослабленным ответом на терапию тиенопиридины [4, 6–8].

Ген тромбоцитарного рецептора фибриногена (*ITGB3*) кодирует бета-3 субъединицу интегрин-комплекса поверхностного рецептора тромбоцитов GPIIb/IIIa, известную также как гликопротеин-3a (GPIIIa). *ITGB3* участвует в межклеточной адгезии и сигнализации, обеспечивает взаимодействие тромбоцита с фибриногеном плазмы крови, что вызывает быструю агрегацию тромбоцитов [8, 9]. Мутация, приводящая к замене лейцина на пролин в 33-м положении белка GPIIIa (замена в положении 1565 T на C в экзоне 2 гена *GPIIIa*) способствует повышенной склонности тромбоцитов к агрегации, что увеличивает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [8–10]. У пациентов с этим вариантом отмечается пониженная эффективность АСК, а также клопидогрела [8, 10].

Очевидно, что влияние полиморфных вариантов некоторых генов на активность тромбоцитов и развитие резистентности к клопидогрелу может иметь определенную вариабельность в зависимости от конкретного региона и популяции. Распространенность полиморфных вариантов G681A гена *CYP2C19*, H1/H2 гена *P2RY12*, T1565C гена *ITGB3* в белорусской популяции изучена

мало. С другой стороны, индивидуальные генетические детерминанты имеют ограниченное клиническое значение, а их комбинированный эффект делает возможной стратификацию групп людей с высоким и низким риском развития тромботических осложнений. Поэтому изучение вклада генетических факторов в формирование ответа на клопидогрел позволит индивидуализировать подход к выбору и режиму дозирования антитромбоцитарных лекарственных средств, что повысит эффективность антитромбоцитарной терапии и снизит риск развития сердечно-сосудистых событий.

Цель исследования – оценка распространения полиморфных вариантов G681A гена *CYP2C19*, H1/H2 гена *P2RY12*, T1565C гена *ITGB3* и изучение их влияния на активность тромбоцитов и эффективность клопидогрела у пациентов со стабильной стенокардией напряжения, проживающих в Гродненском регионе.

Объекты и методы исследования. В исследование было включено 185 человек: 92 пациента от 40 до 72 лет со стабильной стенокардией напряжения (ССН), функциональный класс (ФК) I–III, проходившие обследование и лечение на базе Гродненского областного клинического кардиологического центра, а затем реабилитацию в Гродненской областной клинической больнице медицинской реабилитации, и 93 практически здоровых человека от 32 до 60 лет, которые вошли в контрольную группу. Все обследуемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании, протокол которого (№ 3 от 13.01.2016) был одобрен комитетом по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета.

Критерии включения в контрольную группу: лица обоего пола, отсутствие острых и хронических заболеваний различной этиологии, информированное согласие на участие в исследовании. Критерии включения в группу ССН: наличие ССН, лица обоего пола, прием ДАТТ, информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения из исследования: наличие острого инфаркта миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, тромбоэмболия легочной артерии, тромбофлебит нижних конечностей, наличие фибрилляции/трепетания предсердий, хроническая сердечная недостаточность IIIБ и выше (III ФК по NYHA), наличие сопутствующих острых воспалительных и онкологических заболеваний, активное внутреннее кровотечение, анемии различного генеза, количество тромбоцитов менее 180 тыс/мкл, выраженная почечная и печеночная недостаточность, отказ от участия в исследовании.

Процедуре планового ЧКВ с постановкой стентов были подвергнуты 89 пациентов, 3 пациентам проведена коронарография без постановки стентов. У 60 (67,4 %) пациентов стенты были с лекарственным покрытием, у 29 (32,6 %) – без лекарственного покрытия. Все пациенты принимали бета-блокаторы (бисопролол 5–10 мг или метопролол 50–100 мг), ингибиторы АПФ (лизиноприл 5–20 мг или рамиприл 5–10 мг), статины (аторвастатин 10–20 мг или розувастатин 5–20 мг), молсидомин при болях за грудиной, АСК 75 мг, клопидогрель 75 мг. Ряд пациентов (70 человек) получали лансопризол 30 мг.

Все исследования проводили через 14 дней после проведения ЧКВ и коронарографии.

По стандартной методике выполняли сбор анамнестических данных, физикальное обследование, ЭКГ, эхокардиографию, коронароангиографию для всех пациентов, включенных в исследование. Для исключения артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца (ИБС) у практически здоровых лиц проводили суточное мониторирование артериального давления и велоэргометрию.

Общий анализ крови и исследование морфометрических показателей тромбоцитов (MPV (Mean Platelet Volume) – средний объем тромбоцита, PDW (Platelet Distribution Width) – ширина распределения тромбоцитов по их объему, PCT (Platelet Crit) – тромбокрит (величина, отражающая процент объема тромбоцитов), P-LCR (Large Platelet Ratio) – процент объема больших тромбоцитов (размером более 30 фл) к общему объему тромбоцитов) проводили цитопоточным методом на автоматическом гемоанализаторе Sysmex XS-500i (Япония).

Агрегацию тромбоцитов оценивали при помощи мультieleктродной агрегометрии на импедансном 5-канальном агрегометре Multiplate (Verum Diagnostica GmbH, Германия), используя несколько индукторов агрегации: аденозин-5'-дифосфат (АДФ) (ADP-test) – для выявления чувствительности к клопидогрелю, арахидоновую кислоту (ASPI-test) – для выявления чувстви-

тельности к АСК, пептид активатор тромбин рецепторов (Трап-6) – для отражения потенциальной способности тромбоцитов к агрегации. Построение агрегатограмм и расчет полученных данных проводились автоматически. Основным параметром являлась площадь под агрегационной кривой (area under curve – AUC). Данный показатель наиболее полно отражает тромбоцитарную активность. Переменная AUC представлена в виде единиц (unit – U). Высокую остаточную реактивность тромбоцитов при приеме клопидогрела определяли по данным ADP-test при показателе AUC-агрегатограммы более 50 U [11].

Экстракцию геномной ДНК из лейкоцитов цельной крови осуществляли с помощью набора реагентов «ДНК-ЭКСТРАН-1», ООО «Синтол» (Россия). Молекулярно-биологическое исследование генотипов полиморфных локусов гена тромбоцитарного рецептора фибриногена *ITGB3* (Leu33Pro) rs5918 и гена фермента-метаболизатора цитохрома *CYP2C19* (G681A) rs4244285 проводили методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и с применением реагентов ООО «Синтол» (Россия) на амплификаторе Rotor Geene (Qiagen, Германия). Аллельные варианты генотипа АДФ рецептора тромбоцитов *P2RY12*, H1/H2 (T744C) rs2046934 определяли методом ПЦР с электрофоретической детекцией в камере транслюминатора GelDoc™ XR+ (BioRad, США) и использованием комплекта реагентов ООО НПФ «Литех» (Россия). ПЦР выполняли на амплификаторе – термоциклере AppliedBiosystems 2720 (ThermalCycler, США).

Для статистического анализа полученных данных использовали пакет программ STATISTICA 10.0. Проверку на нормальность распределения проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова и критерия Лиллиефорса (при $p < 0,05$ распределение признака считали отличающимся от нормального). Полученные результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$) при нормальном распределении, в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me [LQ; UQ]) при распределении, отличающемся от нормального. Две независимые группы сравнивали с помощью U -критерия Манна–Уитни. При сравнении долей (процентов) использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса либо Difference tests. Непараметрический корреляционный анализ осуществляли по Спирмену. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Клиническая характеристика обследуемых лиц представлена в табл. 1.

Таблица 1. Клиническая характеристика обследуемых лиц

Table 1. Clinical characteristics of the examined individuals

Показатель	Группа ССН ($n = 92$)	Группа контроля ($n = 93$)
Возраст, лет	59,4 ± 6,8	48,0 ± 7,9***
Мужчины/женщины, n	71 (77,2 %)/21 (22,8 %)	47 (50,5 %)/46 (49,5 %)**
Продолжительность ИБС, лет	3,0 [1,0; 6,5]	–
Инфаркт миокарда в анамнезе, n	45 (48,9 %)	–
Артериальная гипертензия, n /продолжительность, лет	89 (96,7 %)/10 [5,0; 19,0]	–
Курение, n	43 (46,2 %)	18 (19,4 %)**
Продолжительность курения, лет	30,4 ± 12,2	17,2 ± 10,0***
Количество сигарет в сутки	21,6 ± 12,5	14,2 ± 10,3*
Индекс массы тела, кг/м ²	30,4 ± 4,8	26,1 ± 4,2***
Окружность талии, см	103,0 ± 12,1	89,5 ± 14,5***
Лица с ожирением, n	49 (53,3 %)	13 (13,9 %)**
Глюкоза, ммоль/л	5,6 [4,9; 6,5]	5,1 [4,6; 5,3]**
Общий холестерин, ммоль/л	4,61 [3,99; 5,80]	5,56 [4,81; 6,07]***
Триглицериды, ммоль/л	1,84 [1,32; 2,55]	1,32 [1,13; 1,96]**
Креатинин, мкмоль/л	85,0 [83,0; 104,5]	75,0 [67,5; 86,5]***
Скорость клубочковой фильтрации по формуле СКД–ЕРІ, мл/мин/1,73 м ²	73,5 [63,0; 85,5]	90 [88,0; 94,0]***

Примечание. Достоверные отличия между исследуемыми группами: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Как видно из табл. 1, лица, включенные в группу контроля, были моложе, в группе было больше женщин ($\chi^2 = 13,1; p < 0,001$), они меньше курили ($\chi^2 = 14,5; p < 0,001$), у них были меньше индекс массы тела и окружность талии, реже встречались лица с ожирением ($\chi^2 = 30,2; p < 0,001$), содержание общего холестерина было выше, содержание триглицеридов и креатинина – ниже, скорость клубочковой фильтрации – выше.

В табл. 2 показано распределение частоты генотипов и аллелей у обследуемых лиц.

Таблица 2. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов G681A гена *CYP2C19*, H1/H2 гена *P2RY12*, T1565C гена *ITGB3* у обследуемых лиц, %

Table 2. Frequency distribution of alleles and genotypes of polymorphic loci G681A of the *CYP2C19* gene, H1/H2 of the *P2RY12* gene, and T1565C of the *ITGB3* gene in the examined individuals, %

Показатель	Группа ССН			Группа контроля			
	Мужчины + женщины (n = 92)	Мужчины (n = 71)	Женщины (n = 21)	Мужчины + женщины (n = 93)	Мужчины (n = 47)	Женщины (n = 46)	
Полиморфный локус G681A гена <i>CYP2C19</i> , rs4244285							
Генотип	GG	76,1	74,7	81,0	81,7	87,2	76,1
	GA	19,6	22,5	9,5	16,1	8,5	23,9
	AA	4,3	2,8	9,5	2,2	2,3	–
Аллель	G	85,9	85,9	85,7	89,8	91,5	88,0
	A	14,1	14,1	14,3	10,2	8,5	12,0
Полиморфный локус H1/H2 гена <i>P2RY12</i> , rs2046934							
Генотип	H1/H1	59,8	64,8	42,9	53,8	46,8	60,9
	H1/H2	33,7	28,2	52,3 [#]	38,7	48,9	28,2 [#]
	H2/H2	6,5	7,0	4,8	7,5	4,2	10,9
Аллель	H1	76,6	78,9	69,0	73,1	71,3	75,0
	H2	23,4	21,1	30,9	26,9	28,7	25,0
Полиморфный локус T1565C гена <i>ITGB3</i> , rs5918							
Генотип	TT	68,5	70,4	61,9	62,4	65,9	58,7
	TC	28,2	26,8	33,3	33,3	27,7	39,1
	CC	3,3	2,8	4,8	4,3	6,4	2,2
Аллель	T	82,6	83,8	78,6	79,0	79,8	78,3
	C	17,4	16,2	21,4	21,0	20,2	21,7

Примечание. # – достоверные отличия ($p < 0,05$) между мужчинами и женщинами внутри группы.

Распределение частот генотипов генов *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3* соответствовало ожидаемому равновесию Харди–Вайнберга как в группе контроля ($\chi^2 = 1,35, p = 0,24; \chi^2 = 0,02, p = 0,88; \chi^2 = 0,003, p = 0,95$ соответственно), так и в группе пациентов с ССН ($\chi^2 = 3,45, p = 0,06; \chi^2 = 0,32, p = 0,57; \chi^2 = 0,025, p = 0,87$ соответственно).

Как видно из табл. 2, исследуемые группы не отличались по распределению генотипов и аллелей. Однако отмечена большая частота гетерозиготного варианта полиморфного локуса H1/H2 гена *P2RY12* в группе пациентов с ССН среди женщин ($p < 0,05$), а в группе практически здоровых лиц – среди мужчин ($p < 0,05$). В остальном гендерных различий не выявлено. Распространенность носительства генотипов, ассоциированных с возможной вариабельностью ответа на терапию клопидогрелем, среди пациентов со стабильной стенокардией составила по полиморфному локусу G681A гена *CYP2C19* 23,9 %, по полиморфному локусу H1/H2 гена *P2RY12* – 40,2, по полиморфному локусу T1565C гена *ITGB3* – 31,5 %, а среди практически здоровых лиц – 18,3; 46,2; 37,6 % соответственно.

Расчет частоты выявления нескольких мутаций одновременно у одного человека показал, что комбинация трех полиморфизмов выявлена у 1 (1,1 %) пациента из группы ССН и у 3 (3,2 %) человек из группы контроля. Комбинация из двух полиморфизмов выявлена у 20 (21,7 %) пациентов

с ССН и у 17 (18,3 %) лиц из группы контроля, при этом у 11 (11,9 %) пациентов с ССН и у 12 (12,9 %) лиц из группы контроля были мутации в генах *P2RY12* и *ITGB3*, у 3 человек в обеих группах (3,3 и 3,2 % соответственно) – мутации в генах *P2RY12* и *CYP2C19*, у 6 (6,5 %) пациентов с ССН и у 2 (2,1 %) лиц из группы контроля – мутации в генах *CYP2C19* и *ITGB3*. По одному полиморфизму выявлено у 45 (48,9 %) пациентов с ССН и у 52 (55,9 %) практически здоровых лиц. Не выявлено мутаций у 26 (28,2 %) пациентов с ССН и у 21 (22,6 %) человека из группы контроля.

Таким образом, распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов исследуемых генов, а также частота комбинаций мутаций в обеих исследуемых группах были сопоставимы.

Известно, что в разных этнических группах частота аллельных вариантов полиморфного локуса G681A гена *CYP2C19* варьируется. Аллель 681A гена *CYP2C19* чаще встречается у коренных жителей Океании – до 78 % и в странах Южной, Центральной и Восточной Азии – 30–51 %, а в странах Европы его частота варьируется от 8 % в Чехии и 12,7 % в Словении до 20–21 % на Мальте и Кипре [12–14]. У наших ближайших соседей, в Польше, частота встречаемости аллеля 681A гена *CYP2C19* составила 16,3 %, в разных регионах России – от 8 до 14,9 % (в среднем 13,6 %), в Украине – 13,0 % [14–17]. В крупных мета-анализах не приводится данных по Республике Беларусь. Наш результат (в среднем 12,2 %) близок с данными российских, украинских и словенских коллег. По данным литературы, не обнаружено различия в распределении частот аллелей среди здоровых лиц и лиц с ИБС [15–17], что согласуется с результатами нашего исследования.

Согласно литературным данным, частота встречаемости гаплотипа H2 в европейской популяции составляет 8,6–22 % [5, 18–20], в популяции США – до 18,5 [21], в российской популяции – 12,7–17,5 % [15, 17, 22, 23]. В нашем исследовании частота встречаемости гаплотипа H2 была выше и составила в среднем 25,2 %. Взаимосвязь полиморфизма H1/H2 гена *P2RY12* с наличием ИБС обсуждается. В то же время в одних работах обнаружено превалирование гаплотипа H2 среди пациентов с ИБС [24], в других такой связи не выявлено [15, 17, 25]. Нами также не обнаружено различия в распределении частот гаплотипов H1 и H2 между здоровыми лицами и пациентами с ИБС.

Частота встречаемости мутантного аллеля 1565C гена *ITGB3* в польской популяции составила 16 % [10], в английской – 15,7 [26], в европейской – в среднем 15 [27], в российской – 18–22 % [15, 17, 23]. В нашем исследовании частота встречаемости аллеля 1565C гена *ITGB3* составила 19,2 %, что сопоставимо с данными российских и европейских коллег. В некоторых работах отмечена более частая встречаемость аллеля 1565C гена *ITGB3* у пациентов с ИБС [15, 28], тогда как в нашей работе такой разницы не выявлено.

В общей выборке пациентов с ССН получены следующие данные агрегатограммы: ASPI-test – 23,0 [14,0; 37,5] U, ADP-test – 40,5 [25,5; 52,5], TRAP-test – 90,5 [75,0; 108,5] U. Выявлено 24 (26,1 %) пациента с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов по ADP-test (со сниженной чувствительностью к клопидогрелу).

Для дальнейшего анализа пациенты с ССН были разделены на две подгруппы согласно рецессивной модели: подгруппы А (ПГА) составили носители генотипов GG полиморфного локуса G681A гена *CYP2C19*, H1/H1 полиморфного локуса H1/H2 гена *P2RY12* и носители генотипа TT полиморфного локуса T1565C гена *ITGB3*. Подгруппы В (ПГВ) составили носители генотипов GA + AA полиморфного локуса G681A гена *CYP2C19*, H1/H2 + H2/H2 полиморфного локуса H1/H2 гена *P2RY12* и носители генотипов TC + CC полиморфного локуса T1565C гена *ITGB3*.

В табл. 3 представлены показатели агрегометрии у пациентов с ССН с различными генотипами полиморфных локусов G681A гена *CYP2C19*, H1/H2 гена *P2RY12* и T1565C гена *ITGB3*.

Как видно из табл. 3, у лиц ПГВ G681A гена *CYP2C19* и у лиц ПГВ H1/H2 гена *P2RY12* значения ADP-test были выше, чем у лиц ПГА, тогда как в ПГА и ПГВ гена *ITGB3* значения ADP-test были сопоставимы. В ПГА гена *CYP2C19* высокая остаточная реактивность тромбоцитов по ADP-test выявлена у 13 (18,6 %) человек, в то время как в ПГВ гена *CYP2C19* – у 10 (45,5 %), что достоверно чаще ($\chi^2 = 5,1$; $p < 0,05$). В ПГА гена *P2RY12* высокая остаточная реактивность тромбоцитов по ADP-test выявлена у 9 (16,4 %) человек, в то время как в ПГВ гена *P2RY12* –

у 15 (40,5 %), что достоверно чаще ($\chi^2 = 23,8; p < 0,001$). В ПГА гена *ITGB3* высокая остаточная реактивность тромбоцитов по ADP-test выявлена у 20 (31,7 %) человек, в то время как в ПГВ – у 4 (13,8 %), что сопоставимо с показателями ПГА ($\chi^2 = 2,45; p = 0,118$).

Нами не производился расчет зависимости комбинаций мутаций и чувствительности к клопидогрелу, так как комбинация мутаций в генах *P2RY12* и *CYP2C19*, показавших влияние на эффективность клопидогрела, была только у 3 человек.

Таблица 3. Показатели агрегометрии в исследуемых подгруппах лиц со стабильной стенокардией напряжения

Table 3. Aggregometry indices in the study subgroups of the persons with stable stenocardia

Показатель	Полиморфный локус G681A гена <i>CYP2C19</i>		Полиморфный локус H1/H2 гена <i>P2RY12</i>		Полиморфный локус T1565C гена <i>ITGB3</i>	
	ПГА (GG) (n = 70)	ПГВ (GA + AA) (n = 22)	ПГА (H1/H1) (n = 55)	ПГВ (H1/H2 + H2/H2) (n = 37)	ПГА (TT) (n = 63)	ПГВ (TC + CC) (n = 29)
ASPI-test	23,0 [15,0; 36,0]	22,5 [13,0; 70,0]	22,0 [13,0; 34,5]	27,0 [16,0; 50,5]	23,0 [16,0; 38,0]	20,0 [14,0; 34,0]
ADP-test	38,0 [25,0; 50,0]	49,5 [36,0; 60,0]*	40,0 [24,5; 49,5]	46,0 [27,5; 66,0]*	42,0 [26,0; 60,0]	39,0 [28,0; 47,0]
TRAP-test	89,5 [78,0; 108,0]	93,0 [66,0; 109,5]	86,5 [75,0; 108,5]	101,5 [78,0; 113,0]	98,0 [74,0; 111,0]	94,0 [76,0; 111,0]

Примечание. * – достоверные различия ($p < 0,05$) между ПГА и ПГВ.

Согласно литературным данным, полиморфизм G681A гена *CYP2C19* не только ассоциирован с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне приема клопидогрела, но и является независимым предиктором неблагоприятных сердечно-сосудистых событий после имплантации стента при ССН [19, 29, 30]. В нашем исследовании обнаружена взаимосвязь полиморфизма G681A гена *CYP2C19* с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне приема клопидогрела. Однако имеются исследования, в которых не выявлено взаимосвязи полиморфизма G681A гена *CYP2C19* с неблагоприятным прогнозом [31, 32]. Так, в исследовании ARCTIC-GENE было показано, что у медленных метаболизаторов клопидогрела комбинированная конечная точка (смерть, инфаркт миокарда, тромбоз стента, инсульт, экстренная реваскуляризация) была сопоставима с группой быстрых метаболизаторов клопидогрела [32]. Интересно, что у 32 % быстрых метаболизаторов клопидогрела в исследовании ARCTIC-GENE был обнаружен слабый ответ на клопидогрел. Это поддерживает гипотезу о том, что на высокую остаточную реактивность тромбоцитов влияет не только полиморфизм G681A гена *CYP2C19* [32]. В нашем исследовании также встречался недостаточный ответ на клопидогрел у лиц с генотипом GG (18,6 %).

Данные литературы противоречивы в отношении полиморфизма H1/H2 гена *P2RY12* и его ассоциации с повышенной остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне лечения клопидогрелем. В ряде работ не обнаружено взаимосвязи между носительством гаплотипа H2 и недостаточной эффективностью клопидогрела как у пациентов с ССН, так и у пациентов с инфарктом миокарда без подъема сегмента ST [17, 22, 25, 33–35]. Другие авторы показали взаимосвязь между носительством гаплотипа H2 и повышенной остаточной реактивностью тромбоцитов у пациентов с различными формами ИБС [18, 24, 36]. В нашей работе также выявлена взаимосвязь между носительством гаплотипа H2 и повышенной остаточной реактивностью тромбоцитов.

В исследовании Q. Xiang с соавт. [9] было показано, что минорный аллель 1565C гена *ITGB3* связан со снижением агрегации тромбоцитов, вызванной АДФ у здоровых лиц. Нами не обнаружено статистически значимой ассоциации полиморфизма T1565C гена *ITGB3* со степенью агрегации тромбоцитов на фоне приема клопидогрела. Более того, одинаковой оказалась и частота встречаемости повышенных значений агрегатограммы по ADP-test в подгруппах пациентов, полученных согласно рецессивной модели. Полученные нами результаты согласуются с данными российских коллег [22, 34].

В табл. 4 представлены данные общего анализа крови и тромбоцитарные индексы у пациентов с ССН с различными генотипами полиморфных локусов G681A гена *CYP2C19*, H1/H2 гена *P2RY12* и полиморфного локуса T1565C гена *ITGB3*.

Таблица 4. Данные общего анализа крови и тромбоцитарные индексы в исследуемых подгруппах лиц со стабильной стенокардией напряжения

Table 4. Blood test data and platelet indices in the study subgroups of the persons with stable stenocardia

Показатель	Полиморфный локус G681A гена <i>CYP2C19</i>		Полиморфный локус H1/H2 гена <i>P2RY12</i>		Полиморфный локус T1565C гена <i>ITGB3</i>	
	ПГА (GG) (n = 70)	ПГВ (GA + AA) (n = 22)	ПГА (H1/H1) (n = 55)	ПГВ (H1/H2 + H2/H2) (n = 37)	ПГА (TT) (n = 63)	ПГВ (TC + CC) (n = 29)
WBC, $\times 10^9/\text{л}$	7,3 [6,2; 8,6]	7,6 [6,1; 9,5]	7,4 [6,2; 8,8]	7,6 [6,1; 8,7]	7,3 [6,2; 8,8]	7,7 [5,7; 8,4]
RBC, $\times 10^{12}/\text{л}$	4,8 [4,5; 5,1]	4,7 [4,4; 5,1]	4,8 [4,5; 5,1]	4,7 [4,5; 5,2]	4,8 [4,4; 5,1]	4,9 [4,5; 5,0]
Hb, г/л	145,0 [137,0; 158,0]	147,0 [136,0; 151,0]	148,0 [138,0; 156,0]	140,0 [129,0; 157,5]	143,0 [136,0; 156,0]	150,0 [140,0; 158,0]
PLT, $\times 10^9/\text{л}$	224,0 [191,0; 251,0]	222,0 [182,0; 246,0]	227,5 [184,0; 250,0]	220,0 [194,0; 254,0]	222,0 [184,0; 245,0]	231,0 [197,0; 276,0]
MPV, фл	9,3 [8,2; 10,5]	9,7 [8,0; 10,9]	8,7 [8,0; 10,5]	10,0 [8,8; 10,6]*	9,8 [8,3; 10,9]	8,8 [8,0; 10,0]
PDW, %	12,5 [11,4; 13,7]	12,5 [12,1; 15,6]	12,4 [11,9; 13,5]	12,8 [11,2; 15,6]	12,9 [11,9; 14,1]	12,2 [11,5; 13,1]
PCT, %	0,20 [0,17; 0,26]	0,20 [0,15; 0,25]	0,19 [0,15; 0,26]	0,22 [0,18; 0,25]	0,20 [0,17; 0,25]	0,22 [0,15; 0,26]
P-LCR, %	28,9 [25,2; 35,5]	32,3 [28,9; 32,9]	28,8 [25,2; 32,9]	33,1 [28,9; 37,5]*	32,3 [26,2; 37,5]	28,9 [24,2; 31,6]
СОЭ, мм/ч	11,0 [7,0; 18,0]	15,0 [7,0; 23,0]	11,5 [7,0; 19,0]	14,0 [8,0; 20,0]	12,5 [7,0; 20,0]	11,0 [8,0; 16,0]

Примечание. * – достоверные различия ($p < 0,05$) между ПГА и ПГВ.

Как видно из табл. 4, у лиц ПГВ H1/H2 гена *P2RY12* значения MPV, а также частота встречаемости крупных тромбоцитов (P-LCR, %) были выше, чем у лиц ПГА. В остальных группах различия ни по количеству форменных элементов крови, ни по характеристикам тромбоцитов не выявлено.

Имеется небольшое количество работ, в которых исследовалась взаимосвязь значений MPV с полиморфизмом генов. MPV – значимая величина, повышенные значения MPV ($>9,4$ фл) после процедуры ЧКВ связаны с неблагоприятным прогнозом как у пациентов с ССН, так и у лиц с острым коронарным синдромом и являются предикторами недостаточного ответа на клопидогрел [37, 38].

В доступной нам литературе мы не нашли работ, в которых бы исследовалась ассоциация MPV и полиморфизма H1/H2 гена *P2RY12*. В нашем исследовании выявлены ассоциации гаплотипа H2 гена *P2RY12* с высокими значениями MPV тромбоцитов и более высокой частотой встречаемости крупных тромбоцитов (P-LCR), что свидетельствует об изначально высокой реактивности тромбоцитов у носителей гаплотипа H2.

В работе Q. Xiang с соавт. [9] была показана ассоциация полиморфизма T1565C гена *ITGB3* с агрегацией тромбоцитов, но не была обнаружена взаимосвязь данного полиморфизма со значениями MPV у здоровых лиц. В работе T. Kunicki с соавт. [39] не выявлено взаимосвязи между полиморфизмом T1565C гена *ITGB3* со значениями MPV как у здоровых лиц, так и у пациентов с острым коронарным синдромом. В нашем исследовании также не обнаружено ассоциаций между полиморфизмом T1565C гена *ITGB3* и значениями MPV у пациентов с ССН.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что генетический полиморфизм является одним из факторов, определяющих реактивность тромбоцитов. Однако высокая остаточная реактивность тромбоцитов не детерминирована исключительно исследованными

генами, а как мультифакториальное состояние зависит от большого числа генов и их полиморфных вариантов. Более того, агрегационная активность тромбоцитов – это динамический процесс, который подвержен колебаниям во времени и зависит от влияния средовых факторов, поэтому наиболее эффективной в плане подбора персонализированной антитромбоцитарной терапии видится стратегия гибридного подхода, которая состоит в оценке агрегационной активности тромбоцитов и генотипировании пациентов по генам, определяющим реактивность тромбоцитов и метаболизм клопидогрела. Результаты нашего исследования подтверждают гипотезу о необходимости генотипирования пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне приема клопидогрела после процедуры ЧКВ на носительство аллеля 681A гена *CYP2C19* и гаплотипа H2 гена *P2RY12*.

Заключение. В выборке лиц Гродненского региона выявлена высокая распространенность носительства генотипов, ассоциированных с возможной вариабельностью ответа на терапию клопидогрелем, как среди пациентов со стабильной стенокардией, так и среди практически здоровых лиц. Частота встречаемости указанных генотипов среди пациентов со стабильной стенокардией составила 23,9 % для гена *CYP2C19* (полиморфный локус G681A), 40,2 % для гена *P2RY12* (полиморфный локус H1/H2), 31,5 % для гена *ITGB3* (полиморфный локус T1565C), среди практически здоровых лиц – 18,3; 46,2 и 37,6 % соответственно. Выявлены ассоциации между носительством аллеля 681A гена *CYP2C19* и гаплотипа H2 гена *P2RY12* с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне терапии клопидогрелем у пациентов с ССН. Обнаружена ассоциация между носительством гаплотипа H2 полиморфизма H1/H2 гена *P2RY12* с высокими значениями MPV тромбоцитов и более высокой частотой встречаемости крупных тромбоцитов (P-LCR) у пациентов с ССН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Warlo, E. M. K. A brief review on resistance to P2Y12 receptor antagonism in coronary artery disease / E. M. K. Warlo, H. Arnesen, I. Seljeflot // *Thrombosis J.* – 2019. – Vol. 17, N 1. – Art. 11. <https://doi.org/10.1186/s12959-019-0197-5>
2. The personalization of clopidogrel antiplatelet therapy: the role of integrative pharmacogenetics and pharmacometabolomics / A. M. Amin [et al.] // *Cardiol. Res. Pract.* – 2017. – Vol. 2017. – Art. ID 8062796. <https://doi.org/10.1155/2017/8062796>
3. Cytochrome allelic variants and clopidogrel metabolism in cardiovascular diseases therapy / M. Jarrar [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2016. – Vol. 43, N 6. – P. 473–484. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-3983-1>
4. Purinergic receptor P2Y₁₂, G protein coupled, 12 gene variants and risk of incident ischemic stroke, myocardial infarction, and venous thromboembolism / R. Y. Zee [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2008. – Vol. 197, N 2. – P. 694–699. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.001>
5. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects / P. Fontana [et al.] // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108, N 8. – P. 989–995. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085073.69189.88>
6. Association of a functional polymorphism in the clopidogrel target receptor gene, P2Y12, and the risk for ischemic cerebrovascular events in patients with peripheral artery disease / S. Ziegler [et al.] // *Stroke.* – 2005. – Vol. 36, N 7. – P. 1394–1399. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000169922.79281.a5>
7. Gene sequence variations of the platelet P2Y12 receptor are associated with coronary artery disease / U. Cavallari [et al.] // *BMC Med. Genet.* – 2007. – Vol. 8, N 59. – Art. 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-8-59>
8. Каражанова, Л. К. Молекулярно-генетические основы диагностики и лечения ишемической болезни сердца (обзор литературы) / Л. К. Каражанова, Ш. Т. Жукушева, А. А. Чиныбаева // *Наука и здравоохранение.* – 2014. – № 3. – С. 4–11.
9. Identification of ITGA2B and ITGB3 single-nucleotide polymorphisms and their influences on the platelet function / Q. Xiang [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2016. – Vol. 2016. – Art. ID 5675084. <https://doi.org/10.1155/2016/5675084>
10. Evaluation of platelet reactivity during combined antiplatelet therapy in patients with stable coronary artery disease in relation to diabetes type 2 and the GPIIb/IIIa receptor gene polymorphism / M. Jastrzebska [et al.] // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 70, N 2. – P. 175–185. <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.2.01>
11. Calatzis, A. Multiplate platelet function analysis – application and interpretation / A. Calatzis, R. Loreth, M. Spannagl // *Verum Diagnostica GmbH.* – 2007. – P. 1–35.
12. Interethnic variation of CYP2C19 alleles, “predicted” phenotypes and “measured” metabolic phenotypes across world populations / I. Fricke-Galindo [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2016. – Vol. 16, N 2. – P. 113–123. <https://doi.org/10.1038/tj.2015.70>

13. Zhou, Y. Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: a meta-analysis of population-scale sequencing projects / Y. Zhou, M. Ingelman-Sundberg V. M. Lauschke // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2017. – Vol. 102, N 4. – P. 688–700. <https://doi.org/10.1002/cpt.690>
14. Petrović, J. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe / J. Petrović, V. Pešić, V. M. Lauschke // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2020. – Vol. 28, N 1. – P. 88–94. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0480-8>
15. Муслимова, Э. Ф. Молекулярно-генетические факторы развития осложнений после стентирования коронарных артерий у больных хронической ИБС : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.03.03 ; 14.01.05 / Э. Ф. Муслимова ; Сибир. гос. мед. ун-т. – Томск, 2016. – 21 с.
16. Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population / A. Polonikov [et al.] // *Gene.* – 2017. – Vol. 627. – P. 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.004>
17. Возможные генетические предикторы развития сердечно-сосудистых осложнений после коронарного шунтирования / Ю. И. Гринштейн [и др.] // *Кардиология.* – 2018. – Т. 58, № 7. – С. 77–84.
18. Common variation in the platelet receptor P2RY12 gene is associated with residual on-clopidogrel platelet reactivity in patients undergoing elective percutaneous coronary interventions / G. Rudez [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2009. – Vol. 2, N 5. – P. 515–521. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.861799>
19. Routine assessment of on-clopidogrel platelet reactivity and gene polymorphisms in predicting clinical outcome following drug-eluting stent implantation in patients with stable coronary artery disease / Anselmi [et al.] // *JACC: Cardiol. Interv.* – 2013. – Vol. 6, N 11. – P. 1166–1175. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2013.06.010>
20. Association of polymorphisms of platelet receptors GPIa (807C>T), GPVI (13254T>C), and P2Y12 (34C>T and H1/H2 haplotype) with increased risk of periprocedural bleeding in patients undergoing coronary angiography/ percutaneous coronary intervention / M. Sionova [et al.] // *Adv. Interv. Cardiol.* – 2017. – Vol. 13, N 3. – P. 202–209. <https://doi.org/10.5114/aic.2017.70187>
21. Effect of genetic variation in P2Y12 on TRAP-stimulated platelet response in healthy subjects / J. H. Oestreich [et al.] // *J. Thromb. Thrombolysis.* – 2014. – Vol. 38, N 3. – P. 372–379. <https://doi.org/10.1007/s11239-014-1058-5>
22. Резистентность к клопидогрелу и полиморфизмы генов P2RY12 и GPIIIA у больных хронической ишемической болезнью сердца / Т. Ю. Реброва [и др.] // *Клин. медицина.* – 2013. – Т. 91, № 8. – С. 29–31.
23. Страмбовская, Н. Н. Агрегационная активность тромбоцитов у носителей генетического полиморфизма GPIA (C807T), GPIIIA (T1565C), GPIβa (C434T), P2RY12 (H1/H2), SELP (G1087A) тромбоцитарных рецепторов / Н. Н. Страмбовская // *Бюл. ВСНЦ СО РАМН.* – 2013. – № 6 (94). – С. 65–70.
24. P2Y12 receptor gene polymorphism and antiplatelet effect of clopidogrel in patients with coronary artery disease after coronary stenting / N. Zoheir [et al.] // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* – 2013. – Vol. 24, N 5. – P. 525–531. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32835e98bf>
25. Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease / D. J. Angiolillo [et al.] // *Thromb. Res.* – 2005. – Vol. 116, N 6. – P. 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.03.001>
26. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events / T. Simon [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 360, N 4. – P. 363–375. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808227>
27. Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism and coronary artery disease: implications for clinical practice / A. di Castelnuovo [et al.] // *Am. J. Pharmacogenomics.* – 2005. – Vol. 5, N 2. – P. 93–99. <https://doi.org/10.2165/00129785-200505020-00002>
28. Khatami, M. Common rs5918 (PLA1/A2) polymorphism in the ITGB3 gene and risk of coronary artery disease / M. Khatami, M. M. Heidari, S. Soheilyfar // *Arch. Med. Sci. Atheroscler. Dis.* – 2016. – Vol. 1. – P. e9–e15. <https://doi.org/10.5114/amsad.2016.59587>
29. Effects of genetic variants on platelet reactivity and one-year clinical outcomes after percutaneous coronary intervention: a prospective multicentre registry study / H. J. Joo [et al.] // *Sci. Reports.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – Art. 1229. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18134-y>
30. Influence of CYP2C19 genotype on antiplatelet treatment outcomes after percutaneous coronary intervention in patients with coronary heart disease / D. Yu [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2020 – Vol. 19, N 5. – P. 3411–3418. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8592>
31. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and metaanalysis / M. V. Holmes [et al.] // *JAMA.* – 2011. – Vol. 306, N 24. – P. 2704–2714. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1880>
32. Genetic and platelet function testing of antiplatelet therapy for percutaneous coronary intervention: the ARCTIC-GENE study / J.-P. Collet [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 71, N 11. – P. 1315–1324. <https://doi.org/10.1007/s00228-015-1917-9>
33. P2RY12 gene polymorphisms and effect of clopidogrel on platelet aggregation / E. Galić [et al.] // *Coll. Antropol.* – 2013. – Vol. 37, N 2. – P. 491–498.
34. Ассоциация полиморфизмов генов ITGB3, P2RY12, CYP2C19 с функциональной активностью тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца на фоне двухкомпонентной антиагрегантной терапии / Э. Ф. Муслимова [и др.] // *Тер. архив.* – 2017. – Т. 89, № 5. – С. 74–78. <https://doi.org/10.17116/terarkh201789574-78>
35. P2Y12 receptor gene polymorphism and the risk of resistance to clopidogrel: A meta-analysis and review of the literature / G. Cui [et al.] // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2017. – Vol. 26, N 2. – P. 343–349. <https://doi.org/10.17219/acem/63745>
36. Platelet reactivity and clopidogrel resistance are associated with the H2 haplotype of the P2Y12-ADP receptor gene / P. Staritz [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2009. – Vol. 133, N 3. – P. 341–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.12.118>

37. Mean platelet volume and long-term mortality in patients undergoing percutaneous coronary intervention / B. Shah [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 111, N 2. – P. 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.09.014>
38. Increased mean platelet volume is associated with non-responsiveness to clopidogrel / E. Asher [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2014. – Vol. 112, N 1. – P. 137–141. <https://doi.org/10.1160/TH13-10-0845>
39. Mean platelet volume and integrin alleles correlate with levels of integrins α IIb β 3 and α 2 β 1 in acute coronary syndrome patients and normal subjects / T. J. Kunicki [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 32, N 1. – P. 147–152. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.239392>

References

1. Warlo E. M. K., Arnesen H., Seljeflot I. A brief review on resistance to P2Y12 receptor antagonism in coronary artery disease. *Thrombosis Journal*, 2019, vol. 17, no. 1, art. 11. <https://doi.org/10.1186/s12959-019-0197-5>
2. Amin M. A., Chin L. S., Noor D. A. M., Kader M. A. S. A., Hay Y. K., B. Ibrahim. The personalization of clopidogrel antiplatelet therapy: the role of integrative pharmacogenetics and pharmacometabolomics. *Cardiology Research and Practice*, 2017, vol. 2017, art. ID 8062796. <https://doi.org/10.1155/2017/8062796>
3. Jarrar M., Behl S., Manyam G., Ganah H., Nazir M., Nasab R., Khaled M. Cytochrome allelic variants and clopidogrel metabolism in cardiovascular diseases therapy. *Molecular Biology Reports*, 2016, vol. 43, no. 6, pp. 473–484. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-3983-1>
4. Zee R. Y., Michaud S. E., Diehl K. A., Chasman D. I., Emmerich J., Gaussem P., Aiach M., Ridker P. M. Purinergic receptor P2Y₁₂, G protein coupled, 12 gene variants and risk of incident ischemic stroke, myocardial infarction, and venous thromboembolism. *Atherosclerosis*, 2008, vol. 197, no. 2, pp. 694–699. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.001>
5. Fontana P., Dupont A., Gandrille S., Bachelot-Loza C., Reny J.-L., Aiach M., Gaussem P. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*, 2003, vol. 108, no. 8, pp. 989–995. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085073.69189.88>
6. Ziegler S., Schillinger M., Funk M., Felber K., Exner M., Mlekusch W. [et al.]. Association of a functional polymorphism in the clopidogrel target receptor gene, P2Y12, and the risk for ischemic cerebrovascular events in patients with peripheral artery disease. *Stroke*, 2005, vol. 36, no. 7, pp. 1394–1399. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000169922.79281.a5>
7. Cavallari U., Trabetti E., Malerba G., Biscuola M., Girelli D., Olivieri O., Martinelli N., Angiolillo D. J., Corrocher R., Pignatti P. F. Gene sequence variations of the platelet P2Y12 receptor are associated with coronary artery disease. *BMC Medical Genetics*, 2007, vol. 8, no. 59, art. 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-8-59>
8. Karazhanova L. K., Zhukusheva Sh. T., Chinybaeva A. A. Molecular genetic basis for the diagnosis and treatment of coronary heart disease (literature review). *Nauka i zdravookhranenie [Science and healthcare]*, 2014, no. 3, pp. 4–11 (in Russian).
9. Xiang Q., Ji S.-D., Zhang Z., Zhao X., Cui Y.-M. Identification of ITGA2B and ITGB3 single-nucleotide polymorphisms and their influences on the platelet function. *Biomed Research International*, 2016, vol. 2016, art. ID 5675084. <https://doi.org/10.1155/2016/5675084>
10. Jastrzebska M., Lisman D., Szelepajlo A., Oledzki S., Chelstowski K., Clark J. S., Siennicka A. Evaluation of platelet reactivity during combined antiplatelet therapy in patients with stable coronary artery disease in relation to diabetes type 2 and the GPIIb/IIIa receptor gene polymorphism. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2019, vol. 70, no. 2, pp. 175–185. <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.2.01>
11. Calatzis A., Loreth R., Spannagl M. Multiplate platelet function analysis – application and interpretation. *Verum Diagnostica GmbH*, 2007, pp. 1–35.
12. Fricke-Galindo I., Céspedes-Garro C., Rodrigues-Soares F., Naranjo M. E. G., Delgado Á., de Andrés F., López-López M., Peñas-Lledó E., Llerena A. Interethnic variation of CYP2C19 alleles, “predicted” phenotypes and “measured” metabolic phenotypes across world populations. *Pharmacogenomics Journal*, 2016, vol. 16, no. 2, pp. 113–123. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.70>
13. Zhou Y., Ingelman-Sundberg M., Lauschke V. M. Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: a meta-analysis of population-scale sequencing projects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2017, vol. 102, no. 4, pp. 688–700. <https://doi.org/10.1002/cpt.690>
14. Petrović J., Pešić V., Lauschke V. M. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. *European Journal of Human Genetics*, 2020, vol. 28, no. 1, pp. 88–94. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0480-8>
15. Muslimova E. F. *Molecular genetic factors in the development of complications after stenting of coronary arteries in patients with chronic coronary artery disease*. Abstract of Ph. D. diss. Tomsk, 2016. 21 p. (in Russian).
16. Polonikov A., Kharchenko A., Bykanova M., Sirotina S., Ponomarenko I., Bocharova A. [et al.] Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population. *Gene*, 2017, vol. 627, pp. 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.004>
17. Grinshtein Yu. I., Kosinova A. A., Grinshtein I. Yu., Subbotina T. N., Savchenko A. A. Possible genetic predictors of cardiovascular complications after coronary artery bypass grafting. *Kardiologiya [Cardiology]*, 2018, vol. 58, no. 7, pp. 77–84 (in Russian).
18. Rudež G., Bouman H. J., van Werkum J. W., Leebeek F. W. G., Kruit A., Ruven H. J. T., ten Berg J. M., de Maat M. P. M., Hackeng C. M. Common variation in the platelet receptor P2RY12 gene is associated with residual on-clopidogrel platelet reactivity in patients undergoing elective percutaneous coronary interventions. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 2009, vol. 2, no. 5, pp. 515–521. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.861799>

19. Anselmi C. V., Briguori C., Roncarati R., Papa L., Visconti G., Focaccio A., de Micco F., Latronico M. V. G., Pagnotta P., Condorelli G. Routine Assessment of on-clopidogrel platelet reactivity and gene polymorphisms in predicting clinical outcome following drug-eluting stent implantation in patients with stable coronary artery disease. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 2013, vol. 6, no. 11, pp. 1166–1175. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2013.06.010>
20. Sionova M., Blasko P., Jirous S., Vindis D., Rokyta R., Motovska Z. Association of polymorphisms of platelet receptors GPIa (807C>T), GPVI (13254T>C), and P2Y12 (34C>T and H1/H2 haplotype) with increased risk of periprocedural bleeding in patients undergoing coronary angiography/ percutaneous coronary intervention. *Advances in Interventional Cardiology*, 2017, vol. 13, no. 3, pp. 202–209. <https://doi.org/10.5114/aic.2017.70187>
21. Oestreich J. H., Steinhubl S. R., Ferraris S. P., Loftin C. D., Akers W. S. Effect of genetic variation in P2Y12 on TRAP-stimulated platelet response in healthy subjects. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2014, vol. 38, no. 3, pp. 372–379. <https://doi.org/10.1007/s11239-014-1058-5>
22. Rebrova T. Yu., Muslimova E. F., Afanas'ev S. A., Sergienko T. N., Repin A. N. Clopidogrel resistance and polymorphisms of P2RY12 and GPIIIA genes in patients with chronic ischemic heart disease. *Klinicheskaya meditsina* [Clinical medicine], 2013, vol. 91, no. 8, pp. 29–31 (in Russian).
23. Strambovskaia N. N. Aggregation activity of platelets in carriers of genetic polymorphism GPIA (C807T), GPIIIA (T1565C), GPIβα (C434T), P2RY12 (H1 / H2), SELP (G1087A) platelet receptors. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* [Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences], 2013, no. 6 (94), pp. 65–70 (in Russian).
24. Zoheir N., Elhamid S. A., Abulata N., Sobky M. El., Khafagy D., Mostafa A. P2Y12 receptor gene polymorphism and antiplatelet effect of clopidogrel in patients with coronary artery disease after coronary stenting. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2013, vol. 24, no. 5, pp. 525–531. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32835e98bf>
25. Angiolillo D. J., Fernandez-Ortiz A., Bernardo E., Ramirez C., Cavallari U., Trabetti E. [et al.]. Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research*, 2005, vol. 116, no. 6, pp. 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.03.001>
26. Simon T., Verstuyft C., Mary-Krause M., Quteineh L., Drouet E., Méneveau N., Steg P. G., Ferrières J., Danchin N., Becquemont L. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, 2009, vol. 360, no. 4, pp. 363–375. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808227>
27. Di Castelnuovo A., de Gaetano G., Benedetta Donati M., Iacoviello L. Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism and coronary artery disease: implications for clinical practice. *American Journal Pharmacogenomics*, 2005, vol. 5, no. 2, pp. 93–99. <https://doi.org/10.2165/00129785-200505020-00002>
28. Khatami M., Heidari M. M., Soheilyfar S. Common rs5918 (PIA1/A2) polymorphism in the ITGB3 gene and risk of coronary artery disease. *Archives Medical Sciences. Atherosclerotic Diseases*, 2016, vol. 1, pp. e9–e15. <https://doi.org/10.5114/amsad.2016.59587>
29. Joo H. J., Ahn S. G., Park J. H., Park J. Y., Hong S. J., Kim S. Y. [et al.]. Effects of genetic variants on platelet reactivity and one-year clinical outcomes after percutaneous coronary intervention: a prospective multicentre registry study. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, art. 1229. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18134-y>
30. Yu D., Ma L., Zhou J., Li L., Yan W., Yu X. Influence of CYP2C19 genotype on antiplatelet treatment outcomes after percutaneous coronary intervention in patients with coronary heart disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, vol. 19, pp. 3411–3418. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8592>
31. Holmes M. V., Perel P., Shah T., Hingorani A. D., Casas J. P. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and metaanalysis. *JAMA*, 2011, vol. 306, no. 24, pp. 2704–2714. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1880>
32. Collet J.-P., Hulot J.-S., Cuisset T., Rangé G., Cayla G., Van Belle E. [et al.]. Genetic and platelet function testing of antiplatelet therapy for percutaneous coronary intervention: the ARCTIC-GENE study. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2015, vol. 71, no. 11, pp. 1315–1324. <https://doi.org/10.1007/s00228-015-1917-9>
33. Galić E., Vrbanić L., Kapitanović S., Ivković T. C., Petro D., Vuković I., Bsharat R. S., Milicević Z., Vcev A., Mirat J. P2RY12 gene polymorphisms and effect of clopidogrel on platelet aggregation. *Collegium Antropologicum*, 2013, vol. 37, no. 2, pp. 491–498.
34. Muslimova E. F., Afanas'ev S. A., Rebrova T. Yu., Sergienko T. N., Repin A. N. Association of polymorphisms of genes ITGB3, P2RY12, CYP2C19 with functional activity of platelets in patients with ischemic heart disease on the background of two-component antiplatelet therapy. *Terapevticheskii arkhiv* [Therapeutic archives], 2017, vol. 89, no. 5, pp. 74–78. <https://doi.org/10.17116/terarkh201789574-78> (in Russian).
35. Cui G., Zhang S., Zou J., Chen Y., Chen H. P2Y12 receptor gene polymorphism and the risk of resistance to clopidogrel: A meta-analysis and review of the literature. *Advances in Clinical Experimental Medicine*, 2017, vol. 26, no. 2, pp. 343–349. <https://doi.org/10.17219/acem/63745>
36. Staritz P., Kurz K., Stoll M., Giannitsis E., Katus H. A., Ivandic B. T. Platelet reactivity and clopidogrel resistance are associated with the H2 haplotype of the P2Y12-ADP receptor gene. *International Journal Cardiology*, 2009, vol. 133, no. 3, pp. 341–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.12.118>
37. Shah B., Oberweis B., Tummala L., Amoroso N. S., Lobach I., Sedlis S. P., E. Grossi, Berger J. S. Mean platelet volume and long-term mortality in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *American Journal of Cardiology*, 2013, vol. 111, no. 2, pp. 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.09.014>

38. Asher E., Fefer P., Shechter M., Beigel R., Varon D., Shenkman B., Savion N., Hod H., Matetzky S. Increased mean platelet volume is associated with non-responsiveness to clopidogrel. *Thrombosis Haemostasis*, 2014, vol. 112, no. 1, pp. 137–141. <https://doi.org/10.1160/TH13-10-0845>

39. Kunicki T. J., Williams S. A., Nugent D. J., Yeager M. Mean platelet volume and integrin alleles correlate with levels of integrins α IIb β 3 and α 2 β 1 in acute coronary syndrome patients and normal subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2012, vol. 32, no. 1, pp. 147–152. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.239392>

Информация об авторах

Пронько Татьяна Павловна – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: tanya_pronko@mail.ru

Снежицкий Виктор Александрович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vsnez@mail.ru

Горчакова Ольга Владимировна – магистр мед. наук, науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: daniil_go@inbox.ru

Стенуро Татьяна Леонидовна – канд. мед. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: mikhno_t@yahoo.com

Гладкий Максим Леонидович – аспирант. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: cnil@grsmu.by

Information about the authors

Tatyana P. Pronko – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: tanya_pronko@mail.ru

Viktor A. Snezhitskiy – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vsnez@mail.ru

Olga V. Gorchakova – Master of Medicine, Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: daniil_go@inbox.ru

Tatyana L. Stepuro – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: mikhno_t@yahoo.com

Maxim L. Gladkiy – Postgraduate student. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: cnil@grsmu.by

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.728.3-089.28-009.7-02

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-160-168>

Поступила в редакцию 03.02.2021

Received 03.02.2021

О. Л. Эйсмонт

*Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии,
Минск, Республика Беларусь*

ПРИЧИНЫ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ПЕРЕДНИХ БОЛЕЙ ПРИ ТОТАЛЬНОМ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИИ КОЛЕННОГО СУСТАВА

Аннотация. Цель исследования – определить причины послеоперационной передней боли после выполнения тотального эндопротезирования коленного сустава для профилактики их возникновения и улучшения результатов операций.

Проанализированы результаты лечения 77 пациентов (112 случаев), у которых в ГУ «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии» была выполнена операция без эндопротезирования надколенника. Использованы тотальные несвязанные эндопротезы коленного сустава с сохранением задней крестообразной связки. В исследованиях приняли участие 62 (80,5 %) женщины и 15 (19,5 %) мужчин. Средний возраст пациентов (Me (25–75 %)) составил 65 (60–70) лет. С варусной деформацией коленного сустава было 97 (87 %) случаев, с вальгусной деформацией – 15 (13 %). При этом средний угол варусной деформации составил $11,22 \pm 3,81^\circ$, средний угол вальгусной деформации – $11 \pm 4,27^\circ$. Обследование пациентов проводилось при появлении болей через 2–3, 4–5 и 6–7 мес. после операции с использованием клинического, рентгенографического (переднезадняя, боковая и аксиальная проекции, топограмма нижних конечностей), электромиографического, статистического методов.

Причинами передних послеоперационных болей являлись: нарушение установки компонентов эндопротеза и микроциркуляции надколенника (хондролит, аваскулярный некроз надколенника вследствие циркулярной денервации надколенника), дисбаланс в пателлофemorальном суставе, а также функциональные причины передней боли. Боли проявлялись при активной нагрузке на ногу, восстановлении объема движений в колене и силы мышц бедра: при нарушении установки компонентов эндопротеза – в сроки 2–3 мес. (34 (94 %) случая) и 4–5 мес. (2 (6 %)); при нарушении микроциркуляции надколенника – в сроки 4–5 мес. (5 (21 %)) и 6–7 мес. (19 (79 %)); при дисбалансе в пателлофemorальном суставе – в сроки 2–3 мес. (29 (69 %)) и 4–5 мес. (13 (31 %)); при функциональных причинах боли – в сроки 2–3 мес. (7 (70 %)) и 4–5 мес. (3 (30 %)).

Установлено, что причинами послеоперационных передних болей при тотальном эндопротезировании коленного сустава может быть как непосредственно нарушение техники оперативного лечения, так и изменения в кровоснабжении надколенника или в биомеханике пателлофemorального сустава вследствие дисбаланса мышц бедра.

Ключевые слова: остеоартрит, тотальное эндопротезирование коленного сустава, пателлофemorальный болевой синдром

Для цитирования: Эйсмонт, О. Л. Причины послеоперационных передних болей при тотальном эндопротезировании коленного сустава / О. Л. Эйсмонт // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 160–168. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-160-168>

Oleg L. Eismont

Republican Scientific and Practical Centre for Traumatology and Orthopedics, Minsk, Republic of Belarus

ANTERIOR KNEE PAIN CAUSES AFTER TOTAL KNEE ARTHROPLASTY

Abstract. The objective of the study was to determine the causes of postoperative anterior knee pain after total knee arthroplasty for preventing its occurrence and improving the surgery results.

The treatment results of 77 (112 cases) patients with cruciate-retaining total knee arthroplasty without patellar replacement were analyzed. The study involved 62 (80.5 %) women and 15 (19.5 %) men. The average age (Me (25–75 %)) of the patients was 65 (60–70) years. There were 97 cases (87 %) with varus deformity of the knee joint, 15 cases with valgus deformity (13 %). The average angle of varus deformity was $11.22 \pm 3.81^\circ$, the average angle of valgus deformity was $11 \pm 4.27^\circ$. After the anterior pain appeared, patients were examined in 2–3, 4–5 and 6–7 months after surgery using clinical, X-ray (anterior-posterior, lateral and axial projections, topogram of lower extremities), and EMG methods.

The causes of anterior postoperative knee pain were: implant components misplacement, patellar microcirculation disorders (chondrolysis, avascular necrosis due to circular patella denervation), patellofemor joint imbalance, and functional causes. Pain manifested itself at active leg loading and knee motion because of implant components misplacement within 2–3 months in 34 cases (94 %), 4–5 months – in 2 cases (6 %). Patellar microcirculation disorders within 4–5 months – in 5 cases

(21 %), 6–7 months – in 19 (79 %) cases. Imbalance in the patellofemoral joint within 2–3 months – in 29 cases (69 %), 4–5 months – in 13 cases (31 %). Functional causes of pain appeared within 2–3 months – in 7 cases (70 %), 4–5 months – in 3 cases (30 %).

The causes of postoperative anterior pain in total knee arthroplasty can be incorrect surgical technique, changes in patellar blood supply or in the biomechanics of the patellofemoral joint due to the imbalance of the thigh muscles.

Keywords: osteoarthritis, total knee arthroplasty, patellofemoral pain syndrome

For citation: Eismont O. L. Anterior knee pain causes after total knee arthroplasty. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 160–168 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-160-168>

Введение. Проблема боли в переднем отделе коленного сустава – одна из наиболее распространенных после тотального эндопротезирования коленного сустава (ТЭКС) и имеет не только выраженную медицинскую, но и социальную значимость. По данным ряда авторов, боль в переднем отделе коленного сустава после ТЭКС встречается в 4–50 % случаев [1, 2]. В результате хирургических вмешательств происходят изменения, которые влияют на взаимоотношения в пателлофemorальном суставе (ПФС). Результаты последних исследований показывают, что боль легкой и средней степени в переднем отделе коленного сустава присутствует у одной трети пациентов на первом году наблюдения после ТЭКС. Из них 30 % продолжают испытывать боль в течение 10 лет, а у 10 % пациентов она может развиваться в течение 5 лет с момента операции [3, 4].

Передние боли возникают по разным причинам. Но наиболее распространенным является мнение, что боль в переднем отделе коленного сустава после ТЭКС связана с пателлофemorальным отделом [3, 4]. Многие из этих проблем можно было бы избежать при первичном ТЭКС. Тем не менее, при каждом случае возникновения передней боли после ТЭКС должна быть исключена в первую очередь инфекция. Прежде чем связывать симптомы с балансировкой ПФС, нужно исключить другие возможные причины. Переднюю боль также могут вызывать усталостный перелом надколенника, остеонекроз надколенника, хондролитизис надколенника, повреждение разгибательного механизма голени и его мышечная атрофия, а также комплексный регионарный болевой синдром [5–8]. Дистантные патологии, такие как иррадирующие боли от тазобедренного сустава и поясничного отдела позвоночника, могут также имитировать переднюю боль колена [9]. Надколенник может располагаться дисконгруэнтно в борозде блока бедра, что может приводить к наклону, подвывиху, импиджменту, латеральной гиперпрессии и рецидивирующим вывихам надколенника [10]. Кроме того, пателлофemorальные проблемы после ТЭКС зависят от того, увеличивается ли пателлофemorальное давление и влияет ли это на мышечный рычаг. Причинами этого являются ошибки при установке офсета бедренного компонента эндопротеза, завышение размеров компонентов эндопротеза, нарушение ротационной и фронтальной установок бедренного и большеберцового компонентов эндопротеза. Все это может приводить к нарушению баланса в ПФС, а также к асептическому расшатыванию компонентов эндопротеза. Но, несмотря на наиболее распространенное на сегодняшний день мнение о том, что передняя боль в коленном суставе наиболее часто связана с пателлофemorальным контактом, нет четкого консенсуса относительно этиологии, лечения и профилактики этой боли при ТЭКС [11, 12].

Цель настоящего исследования – определить причины послеоперационных передних болей после тотального эндопротезирования коленного сустава для профилактики их возникновения и улучшения результатов операций.

Материалы и методы исследования. Для изучения причин послеоперационных болей при ТЭКС проанализированы результаты лечения 77 пациентов (112 случаев), у которых за период с 2010 по 2016 г. в ортопедическом отделении № 2 ГУ «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии» (РНПЦТО) было выполнено оперативное вмешательство с использованием традиционной оперативной техники ТЭКС, описанной в руководствах и принятой в РНПЦТО [13–15].

Критерии исключения из исследования: воспалительные артропатии, пателлофemorальная нестабильность, остеотомии большеберцовой кости, предшествующие переломы надколенника, септический остеоартрит, выраженная (более 15°) варусно-вальгусная деформация или фиксированная сгибательно-разгибательная контрактура, сопутствующие заболевания и патология других суставов нижних конечностей, ограничивающие двигательную способность.

В исследовании приняли участие 62 (80,5 %) женщины и 15 (19,5 %) мужчин. Средний возраст пациентов (Me (25–75 %)) составил 65 (60–70) лет.

С варусной деформацией коленного сустава было 97 (87 %) случаев, с вальгусной деформацией – 15 (13 %). При этом средний угол варусной деформации составил $11,22 \pm 3,81^\circ$, средний угол вальгусной деформации – $11 \pm 4,27^\circ$.

При эндопротезировании во всех случаях использовали тотальные несвязанные эндопротезы коленного сустава следующих фирм-производителей: Stryker, Covision, W. Link, Biomet, DePuy Johnson & Johnson.

При анализе клинического материала использовали клинический, рентгенографический, электромиографический и статистический методы. Обследование проводили при появлении болей через 2–3, 4–5 и 6–7 мес. после операции.

Клиническое обследование пациентов выполнялось по общепринятым методикам и заключалось в уточнении характера жалоб пациента, подробном выяснении анамнеза заболевания и жизни, ортопедическом осмотре [16, 17].

Рентгенографическое исследование включало рентгенограммы коленных суставов в двух стандартных проекциях (передне-задней и боковой), аксиальный снимок надколенника и топограмму нижних конечностей.

Тяжесть дегенеративно-дистрофического процесса коленного сустава определяли по общепринятой классификации рентгенологических признаков артроза, разработанной И. Келгреном и И. Лоуренсом [18].

На полученных после эндопротезирования снимках определяли правильность установки эндопротеза, механическую и анатомическую оси конечности, угол наклона надколенника. Рентгенологическими показателями правильной установки и стабильности компонентов эндопротеза считали:

- 1) правильное пространственное соотношение компонентов;
- 2) соответствие размеров эндопротеза объему и форме мыщелков бедренной кости, плато большеберцовой кости;
- 3) отсутствие костных повреждений на уровне компонентов эндопротеза;
- 4) отсутствие диастаза между костной тканью и цементом;
- 5) правильность механической оси.

Электромиографическое обследование выполняли с использованием методов суммарной и стимуляционной электромиографии.

Статистический анализ полученных данных был осуществлен при помощи методов описательной статистики с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc, США). Учитывая малые объемы выборки, а также проведенный статистический анализ оцениваемых критериев, выявивший асимметричное распределение данных, использовали методы непараметрической статистики.

Результаты и их обсуждение. В нашем исследовании при эндопротезировании во всех случаях использовали тотальные несвязанные эндопротезы коленного сустава с сохранением задней крестообразной связки. Данный тип эндопротеза был использован в случаях не резко выраженной осевой деформации в коленном суставе ($<15^\circ$ варуса, $<15^\circ$ вальгуса) обследуемых пациентов [13–15].

Эндопротезирование суставной поверхности надколенника не выполнялось ни в одном случае, поскольку данная процедура не решает проблему боли в переднем отделе коленного сустава после ТЭКС, а лишь увеличивает риск возможных послеоперационных осложнений [19].

Причинами передних послеоперационных болей являлись: нарушение установки компонентов эндопротеза, нарушение микроциркуляции надколенника (хондролиз, аваскулярный некроз надколенника вследствие циркулярной денервации надколенника), дисбаланс в пателлофemorальном суставе (ПФС), а также функциональные причины боли.

Боли проявлялись при активной нагрузке на ногу, восстановлении объема движений в колене и силы мышц бедра: при нарушении установки компонентов эндопротеза – в сроки 2–3 мес. (34 (94 %) случая) и 4–5 мес. (2 (6 %)); при нарушении микроциркуляции надколенника – в сроки 4–5 мес. (5 (21 %)) и 6–7 мес. (19 (79 %)); при дисбалансе в ПФС – в сроки 2–3 мес. (29 (69 %)) и 4–5 мес.

(13 (31 %)); при функциональных причинах боли – в сроки 2–3 мес. (7 (70 %)) и 4–5 мес. (3 (30 %)). Распределение пациентов по причинам передней боли и срокам возникновения боли после ТЭКС представлены в таблице.

Нарушение установки компонентов эндопротеза. При анализе результатов в 36 (100 %) случаях выявлено некорректное стояние бедренного или большеберцового компонентов эндопротеза в сагиттальной или фронтальной плоскостях, что послужило причиной возникновения передней боли после ТЭКС.

Нарушение установки большеберцового компонента эндопротеза. В 3 (8 %) случаях в сагиттальной плоскости выявлен наклон большеберцового компонента кпереди. Этот наклон способствовал нарушению сгибания в коленном суставе, приводя к разгибательной контрактуре, а также к постоянному повышению давления на передний отдел коленного сустава, что вызывало передние боли [20, 21].

В 9 (25 %) случаях в сагиттальной плоскости был завышен угол наклона большеберцового компонента кзади. Это вызывало нестабильность в большеберцово-бедренном отделе сустава, увеличивая давление на передние отделы сустава, чем и было обусловлено возникновение передней боли [20–22].

Распределение пациентов в зависимости от причин и сроков возникновения передней боли после ТЭКС

Distribution of patients by the causes and timing of anterior pain after TKA

Причина передней боли	К-во случаев			
	всего	через 2–3 мес.	через 4–5 мес.	через 6–7 мес.
Нарушение установки компонентов эндопротеза	36 (32 %)	34 (94 %)	2 (6 %)	
Нарушение микроциркуляции надколенника	24 (21 %)		5 (21 %)	19 (79 %)
Дисбаланс в ПФС	42 (38 %)	29 (69 %)	13 (31 %)	
Функциональные причины	10 (9 %)	7 (70 %)	3 (30 %)	

Медиализация большеберцового компонента выявлена в 7 (19 %) случаях. Большеберцовый компонент, который размещен медиально, выводил бугристость большеберцовой кости в относительно латерализованное положение. Это оказывало влияние на увеличение Q-угла, что приводило к латеропозиции надколенника и повышенному давлению в передне-латеральном отделе пателлофemorального сустава, обуславливая боль в переднем отделе коленного сустава после ТЭКС [22].

Установка большеберцового компонента кзади в сагиттальной плоскости отмечалась в 10 (28 %) случаях. Существует связь между увеличением контактного давления в ПФС и позиционированием большеберцового компонента в сагиттальной плоскости кзади (6 мм и более). При такой установке пателлофemorальное контактное давление увеличивается, чем обусловлены передние боли после ТЭКС. Корректной установкой большеберцового компонента для уменьшения пателлофemorального контактного давления при ТЭКС является нейтральное расположение в сагиттальной плоскости или кзади (3 мм) [23].

Нарушение установки бедренного компонента эндопротеза. Увеличение переднего офсета (смещения) бедренного компонента эндопротеза, выявленное в 2 (6 %) случаях, являлось нарушением установки бедренного компонента в сагиттальной плоскости. Передний офсет имеет большое влияние на биомеханику ПФС. Излишнее переднее выступание бедренного компонента могло быть вызвано его неправильным подбором (большим по размеру [24, 25]) или чрезмерно малой передней резекцией, что привело к выпячиванию переднего фланга бедренного компонента. Это способствовало повышенному давлению на надколенник и окружающие его мягкотканые структуры и, соответственно, передним болям в коленном суставе.

В 2 (6 %) случаях бедренный компонент был установлен с наклоном кпереди. Такая его установка создает приподнятое расположение переднего фланга, вызывая тем самым импиджмент между надколенником и проксимальной частью блока бедренного компонента, что вызывает боли и крепитацию в переднем отделе коленного сустава [26].

Медиализация бедренного компонента выявлена в 3 (8 %) случаях. Отметим, что такой медиализации следует избегать, так как она способствует увеличению Q-угла и повышает напряжение в латеральном отделе ПФС. Это приводит к латеропозиции надколенника и повышению давления в ПФС, вызывая образование латерального остеофита надколенника с последующим импиджментом и, как следствие, боль в переднем отделе коленного сустава после ТЭКС [27].

Нарушение микроциркуляции надколенника. Для профилактики и лечения передней боли при ТЭКС используется циркулярная денервация надколенника элетрокоагулятором [28]. Однако циркулярная денервация может стать причиной разрушения суставного хряща (хондролиза), а также аваскулярного некроза надколенника в результате нарушения микроциркуляции в нем [29].

В 24 (100 %) случаях причиной передних болей являлось нарушение микроциркуляции надколенника вследствие выполненной циркулярной термической его денервации, что в 22 (92 %) случаях привело к хондролизу надколенника, а в 2 (8 %) – к его аваскулярному некрозу.

Капсульно-связочный дисбаланс в ПФС. В 42 (100 %) случаях выявлен капсульно-связочный дисбаланс в ПФС, что явилось причиной возникновения передней боли после ТЭКС. У всех пациентов данной группы выявлено нарушение конгруэнтности в ПФС: латеральная гиперпрессия надколенника с его наклоном более 5° (15 (36 %) случаев), латеральная гиперпрессия надколенника с образованием латерального остеофита на фоне повышенного давления на передне-латеральный отдел ПФС (23 (55 %)), подвывих надколенника (4 (9 %)).

При анализе данных нами не выявлено четкой взаимосвязи между видом деформации (варус, вальгус) до операции и изменением угла наклона надколенника. В 36 (86 %) случаях угол наклона надколенника был выше нормы (более 5°). Таким образом, поскольку во всех случаях имела деформация (варусная или вальгусная), наклон надколенника, скорее всего, связан с нарушением механической оси нижней конечности, что напрямую влияло на конгруэнтность в ПФС.

Латеральная гиперпрессия надколенника. При анализе послеоперационных данных в 15 (36 %) случаях латеральная гиперпрессия надколенника сопровождалась его наклоном, что привело к нарушению конгруэнтности в ПФС. Причиной возникновения (сохранения после операции) латеральной гиперпрессии с наклоном надколенника служило либо неполноценное интраоперационное выполнение релиза латерального сухожильного растяжения, либо некорректное определение трекинга надколенника. Вследствие перегрузки латерального отдела ПФС развились передние боли в коленном суставе [22, 30, 31].

Латеральная гиперпрессия надколенника в сочетании с латеральным остеофитом. В 23 (55 %) случаях выявлена латеральная гиперпрессия надколенника в сочетании с образованием латерального остеофита, что привело к нарушению конгруэнтности в ПФС.

Подвывих надколенника. В 4 (9 %) случаях отмечался наклон надколенника в сочетании с его подвывихом, что привело к нарушению конгруэнтности в ПФС и болям в колене.

Функциональные причины передней боли после ТЭКС. Проведены электромиографические обследования мышц нижних конечностей группы пациентов с гонартрозом (10 (100 %) случаев), которые предъявляли жалобы на передние боли в коленном суставе как до операции, так и после ТЭКС. Как известно, широкие мышцы бедра являются стабилизаторами коленного сустава, осуществляют моторную деятельность в фазе экстензии, оказывают огромное влияние на ПФС. Значимый вклад в возникновение передней боли вносит измененная биомеханика ПФС, которая усугубляется также несостоятельностью мышц бедра, особенно разгибательным аппаратом коленного сустава. Сопоставление параметров биоэлектрической активности (БА) *m. quadriceps* показало, что медиальная порция ее подвержена более резким изменениям по сравнению с *m. vastus lateralis*. Это обусловлено большей площадью и особой топографией латеральной порции, позволяющей ей активизироваться уже при начальных 30° экстензии, в то время как медиальная порция подключается только в последние 20–15° и практически не может участвовать в напряжении в условиях болевого синдрома или сгибательной контрактуры. Отличия амплитуд БА флексоров – *m. biceps femoris*, *m. semitendinosus* – на пораженной и интактной стороне, а также по сравнению с контрольными данными были относительно умеренными и составляли 25–30 %.

Проведенные физиологические обследования показывают, что оперативное вмешательство сопровождается в ближайшем послеоперационном периоде изменением моторной и рефлекторной

возбудимости, резким снижением (на 50–70 %) активности мышц голени и бедра, особенно у пациентов с выраженным дефицитом нейромоторной функции до операции [5–8].

Таким образом, выявленная до и после имплантации эндопротеза коленного сустава выраженная слабость *vastus medialis*, несбалансированность ее активности с *m. vastus lateralis*, изменение параметров БА *m. biceps femoris*, *m. semitendinosus*, *m. tensor fasciae latae* ведет к несоответствию их функциональных взаимоотношений и к повышенной тяге надколенника кнаружи, что создает перенагрузку передне-наружного отдела коленного сустава и оказывает компрессионное воздействие на нервные структуры, чем и обусловлена боль у данных пациентов [32, 33]. Динамический анализ результатов показывает, что спустя 12–14 мес. еще имеется дефицит моторной функции мышц, а оптимальное восстановление может занять около 2 лет и более. В связи с этим огромную роль играет предоперационная подготовка пациентов.

Выводы

1. При обследовании 77 пациентов в 112 (100 %) случаях причинами послеоперационных передних болей после ТЭКС являлись: нарушение установки компонентов эндопротеза (36 (32 % случаев)), капсульно-связочный дисбаланс в ПФС (42 (38 %)), нарушение микроциркуляции надколенника (24 (21 %)) и изменение биомеханики ПФС вследствие дисбаланса четырехглавой мышцы бедра (10 (9 %)).

2. В 36 (100 %) случаях выявлено некорректное стояние бедренного или большеберцового компонентов эндопротеза в сагиттальной (26 (72 % случаев)) и фронтальной (10 (28 %)) плоскостях, что привело к нарушению конгруэнтности, повышению давления в ПФС и послужило причиной возникновения передней боли после ТЭКС.

3. В 24 (100 %) случаях причиной передних болей у пациентов анализируемой группы являлось нарушение микроциркуляции надколенника вследствие выполненной циркулярной термической денервации надколенника, что привело к хондролиту надколенника в 22 (92 %) случаях, а в 2 (8 %) наблюдениях – к его аваскулярному некрозу.

4. Капсульно-связочный дисбаланс в ПФС в 42 (100 %) случаях явился причиной возникновения передней боли после ТЭКС. Вследствие этого у пациентов данной группы выявлены различные виды нарушения конгруэнтности в ПФС: латеральная гиперпрессия надколенника с его наклоном (15 (36 % случаев)), латеральная гиперпрессия надколенника с образованием латерального остеофита на фоне повышенного давления на передне-латеральный отдел ПФС (23 (55 %)), подвывих надколенника (4 (9 %)).

5. В 10 (100 %) наблюдениях выраженные послеоперационные передние боли были связаны с нарушениями биомеханики ПФС вследствие неравномерного снижения активности мышц бедра при тяжелых формах остеоартрита коленного сустава. Физиологические критерии функционального состояния мышц – снижение амплитуды биоэлектрической активности *m. vastus medialis*, *m. vastus lateralis*, *m. tensor fasciae latae*, *m. biceps fem.*, *mm. gastrocnemius* на 22–70 %, рефлекторной возбудимости (Н/М %) ниже 40 % – отражают закономерности развития периферических изменений и функции моторных ядер пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга, являются основой для оценки динамики лечения при тотальном эндопротезировании коленного сустава.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Less anterior knee pain with a mobile-bearing prosthesis compared with a fixed-bearing prosthesis / S. J. Breugem [et al.] // Clin. Orthop. Relat. Res. – 2008. – Vol. 466, N 8. – P. 1959–1965. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0320-6>
2. Patellar resurfacing in total knee arthroplasty. A prospective, randomized, double-blind study with five to seven years of follow-up / R. L. Barrack [et al.] // J. Bone Joint Surg. Am. – 2001. – Vol. 83-A, N 9. – P. 1376–1381. <https://doi.org/10.2106/00004623-200109000-00013>
3. Different factors conduct anterior knee pain following primary total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis / G. Duan [et al.] // J. Arthroplasty. – 2018. – Vol. 33, N 6. – P. 1962–1971e3. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2017.12.024>
4. Maistrelli, G. L. Anterior knee pain in total knee arthroplasty / G. L. Maistrelli // GIOT. – 2012. – Vol. 38, suppl. 2. – P. S157–S159.

5. *In vivo* patellar tracking induced by individual quadriceps components in individuals with patellofemoral pain / F. Lin [et al.] // *J. Biomech.* – 2010. – Vol. 43, N 2. – P. 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.08.043>
6. Mizner, R. L. Altered loading during walking and sit-to-stand is affected by quadriceps weakness after total knee arthroplasty / R. L. Mizner, L. Snyder-Mackler // *J. Orthop. Res.* – 2005. – Vol. 23, N 5. – P. 1083–1090. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2005.01.021>
7. Mizner, R. L. Quadriceps strength and the time course of functional recovery after total knee arthroplasty / R. L. Mizner, S. C. Petterson, L. Snyder-Mackler // *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* – 2005. – Vol. 35, N 7. – P. 424–436. <https://doi.org/10.2519/jospt.2005.35.7.424>
8. Preoperative quadriceps strength predicts functional ability one year after total knee arthroplasty / R. L. Mizner [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2005. – Vol. 32, N 8. – P. 1533–1539.
9. Burnett, R. S. Indications for patellar resurfacing in total knee arthroplasty / R. S. Burnett, R. B. Bourne // *Instr. Course Lect.* – 2004. – Vol. 53. – P. 167–186.
10. Patellofemoral pain after total knee arthroplasty: clinical pathway and review of the literature / H. R. Springorum [et al.] // *Der Orthopäde.* – 2011. – Vol. 40, N 10. – Art. 907. <https://doi.org/10.1007/s00132-011-1779-5>
11. Collado, H. Patellofemoral pain syndrome / H. Collado, M. Fredericson // *Clin. Sports Med.* – 2010. – Vol. 29, N 3. – P. 379–398. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2010.03.012>
12. Secondary resurfacing of the patella for persistent anterior knee pain after primary knee arthroplasty / H. E. Muoneke [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Br. vol.* – 2003. – Vol. 85-B, N 5. – P. 675–678. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.85b5.13787>
13. Cho, W. S. Knee joint athroplasty / W. S. Cho. – London : Springer, 2013. – 317 p.
14. Scott, W. N. Insall & Scott surgery of the knee / W. N. Scott. – 5th ed. – N. Y. : Elsevier, 2012. – 1504 p.
15. Scuderi, G. R. Surgical techniques in total knee arthroplasty / R. G. Scuderi, A. J. Tria. – N. Y. : Springer-Verlag, 2002. – 773 p.
16. Маркс, В. О. Ортопедическая диагностика : рук.-справ. / В. О. Маркс. – Минск : Наука и техника, 1978. – 511 с.
17. Хегглин, Ю. Хирургическое обследование : пер. с нем. / Ю. Хегглин. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1991. – 462 с.
18. Kellgren, J. H. Radiologic assessment of osteo-arthrosis / J. H. Kellgren, J. S. Lawrence // *Ann. Rheum. Dis.* – 1957. – Vol. 16, N 4. – P. 494–502. <https://doi.org/10.1136/ard.16.4.494>
19. The outcome of total knee arthroplasty with and without patellar resurfacing up to 17 Years: a report from the Australian orthopaedic association national joint replacement registry / J. A. Coory [et al.] // *J. Arthroplasty.* – 2020. – Vol. 35, N 1. – P. 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2019.08.007>
20. Radiographs are not sufficient for evaluation of component fit in subtle knee pain after total knee arthroplasty / M. E. Simsek [et al.] // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* – 2020. – Vol. 28, N 6. – P. 2015–2022. <https://doi.org/10.1007/s00167-020-05940-7>
21. Waelchli, B. Dislocation of the polyethylene inlay due to anterior tibial slope in revision total knee arthroplasty / B. Waelchli, J. Romero // *Knee Surg., Sports Traumatol., Arthrosc.* – 2001. – Vol. 9, N 5. – P. 296–298. <https://doi.org/10.1007/s001670100203>
22. McPherson, E. J. Patellar tracking in primary total knee arthroplasty / E. J. McPherson // *Instr. Course. Lect.* – 2006. – Vol. 55. – P. 439–448.
23. Anteroposterior positioning of the tibial component and its effect on the mechanics of patellofemoral contact / K. Didden [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Br. vol.* – 2010. – Vol. 92, N 10. – P. 1466–1470. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.92b10.24221>
24. Association between femoral component sagittal positioning and anterior knee pain in total knee arthroplasty a 10-year case-control follow-up study of a cruciate-retaining single-radius design / C. E. H. Scott [et al.] // *J. Bone Joint Surg.* – 2019. – Vol. 101, N 17. – P. 1575–1585. <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.18.01096>
25. Upsizing the femoral component increases patellofemoral contact force in total knee replacement / S. Kawahara [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Br. vol.* – 2012. – Vol. 94, N 1. – P. 56–61. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.94b1.27514>
26. The John Insall Award: control-matched evaluation of painful patellar Crepitus after total knee arthroplasty / D. A. Dennis [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2011. – Vol. 469, N 1. – P. 10–17. <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1485-3>
27. Hungerford, D. Biomechanics of the patellofemoral joint / D. Hungerford, M. Barry // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1979. – N 144. – P. 9–15. <https://doi.org/10.1097/00003086-197910000-00003>
28. Does circumferential patellar denervation result in decreased knee pain and improved patient-reported outcomes in patients undergoing nonresurfaced, simultaneous bilateral TKA? / N. C. Budhiparama [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2020. – Vol. 478, N 9. – P. 2020–2033. <https://doi.org/10.1097/corr.0000000000001035>
29. Rand, J. A. Effect of electrocautery on fresh human articular cartilage / J. A. Rand, T. A. Gaffey // *Arthroscopy. J. Arthrosc. Relat. Surg.* – 1985. – Vol. 1, N 4. – P. 242–246. [https://doi.org/10.1016/s0749-8063\(85\)80091-8](https://doi.org/10.1016/s0749-8063(85)80091-8)
30. Bindelglass, D. F. Patellar tilt and subluxation in total knee arthroplasty. Relationship to pain, fixation, and design / D. F. Bindelglass, J. L. Cohen, L. D. Dorr // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1993. – N 286. – P. 103–109. <https://doi.org/10.1097/00003086-199301000-00016>
31. Malrotation causing patellofemoral complications after total knee arthroplasty / R. A. Berger [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1998. – N 356. – P. 144–153. <https://doi.org/10.1097/00003086-199811000-00021>
32. Anterior knee pain after total knee arthroplasty: does it correlate with patellar blood flow? / S. Kohl [et al.] // *Knee Surg., Sports Traumatol., Arthrosc.* – 2011. – Vol. 19, N 9. – P. 1453–1459. <https://doi.org/10.1007/s00167-011-1418-z>
33. The relative timing of VMO and VL in the aetiology of anterior knee pain: a systematic review and meta-analysis / R. Chester [et al.] // *BMC Musculoskelet. Disord.* – 2008. – Vol. 9, N 1. – Art. 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-9-64>

References

1. Breugem S. J. M., Sierveelt I. N., Schafroth M. U., Blankevoort L., Schaap G. R., van Dijk C. N. Less anterior knee pain with a mobile-bearing prosthesis compared with a fixed-bearing prosthesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2008, vol. 466, no. 8, pp. 1959–1965. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0320-6>
2. Barrack R. L., Bertot A. J., Wolfe M. W., Waldman D. A., Milicic M., Myers L. Patellar resurfacing in total knee arthroplasty. A prospective, randomized, double-blind study with five to seven years of follow-up. *Journal of Bone and Joint Surgery-American*, 2001, vol. 83-A, no. 9, pp. 1376–1381. <https://doi.org/10.2106/00004623-200109000-00013>
3. Duan G., Liu C., Lin W., Shao J., Fu K., Niu Y., Wang F. Different factors conduct anterior knee pain following primary total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Arthroplasty*, 2018, vol. 33, no. 6, pp. 1962–1971e3. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2017.12.024>
4. Maistrelli, G. L. Anterior knee pain in total knee arthroplasty. *GIOT*, 2012, vol. 38, suppl. 2, pp. S157–S159.
5. Lin F., Wilson N. A., Makhous M., Press J. M., Koh J. L., Nuber G. W., Zhang L.-Q. *In vivo* patellar tracking induced by individual quadriceps components in individuals with patellofemoral pain. *Journal of Biomechanics*, 2010, vol. 43, no. 2, pp. 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.08.043>
6. Mizner R. L., Snyder-Mackler L. Altered loading during walking and sit-to-stand is affected by quadriceps weakness after total knee arthroplasty. *Journal of Orthopaedic Research*, 2005, vol. 23, no. 5, pp. 1083–1090. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2005.01.021>
7. Mizner R. L., Petterson S. C., Snyder-Mackler L. Quadriceps strength and the time course of functional recovery after total knee arthroplasty. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 2005, vol. 35, no. 7, pp. 424–436. <https://doi.org/10.2519/jospt.2005.35.7.424>
8. Mizner R. L., Petterson S. C., Stevens J. E., Axe M. J., Snyder-Mackler L. Preoperative quadriceps strength predicts functional ability one year after total knee arthroplasty. *Journal of Rheumatology*, 2005, vol. 32, no. 8, pp. 1533–1539.
9. Burnett R. S., Bourne R. B. Indications for patellar resurfacing in total knee arthroplasty. *Instructional Course Lectures*, 2004, vol. 53, pp. 167–186.
10. Springorum H. R., Rath B., Baier C., Lechler P., Lüring C., Grifka J. Patellofemoral pain after total knee arthroplasty: clinical pathway and review of the literature. *Der Orthopäde*, 2011, vol. 40, no. 10, art. 907. <https://doi.org/10.1007/s00132-011-1779-5>
11. Collado H., Fredericson M. Patellofemoral pain syndrome. *Clinics in Sports Medicine*, 2010, vol. 29, no. 3, pp. 379–398. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2010.03.012>
12. Muoneke H. E., Khan A. M., Giannikas K. A., Hägglund E., Dunningham T. H. Secondary resurfacing of the patella for persistent anterior knee pain after primary knee arthroplasty. *Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 2003, vol. 85-B, no. 5, pp. 675–678. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.85b5.13787>
13. Cho W. S. *Knee joint arthroplasty*. London, Springer, 2013. 317 p.
14. Scott W. N. *Insall & Scott surgery of the knee. 5th ed.* New York, Elsevier, 2012. 1504 p.
15. Scuderi G. R., Tria A. J. *Surgical techniques in total knee arthroplasty*. New York, Springer-Verlag, 2002. 773 p.
16. Marks V. O. *Orthopedic diagnostics: reference guide*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1978. 511 p. (in Russian).
17. Hegglin U. *Surgical examination. 2nd ed.* Moscow, Meditsina Publ., 1991. 462 p. (in Russian).
18. Kellgren J. H., Lawrence J. S. Radiologic assessment of osteo-arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1957, vol. 16, no. 4, pp. 494–502. <https://doi.org/10.1136/ard.16.4.494>
19. Coory J. A., Tan K. G., Whitehouse S. L., Hatton A., Graves S. E., Crawford R. W. The outcome of total knee arthroplasty with and without patellar resurfacing up to 17 years: a report from the Australian orthopaedic association national joint replacement registry. *Journal of Arthroplasty*, 2020, vol. 35, no. 1, pp. 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2019.08.007>
20. Simsek M. E., Gursoy S., Akkaya M., Kapicioglu M. I. S., Bozkurt M. Radiographs are not sufficient for evaluation of component fit in subtle knee pain after total knee arthroplasty. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2020, vol. 28, no. 6, pp. 2015–2022. <https://doi.org/10.1007/s00167-020-05940-7>
21. Waelchli B., Romero J. Dislocation of the polyethylene inlay due to anterior tibial slope in revision total knee arthroplasty. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2001, vol. 9, no. 5, pp. 296–298. <https://doi.org/10.1007/s001670100203>
22. McPherson E. J. Patellar tracking in primary total knee arthroplasty. *Instructional Course Lectures*, 2006, vol. 55, pp. 439–448.
23. Didden K., Luyckx T., Bellemans J., Labey L., Innocenti B., Vandenuecker H. Anteroposterior positioning of the tibial component and its effect on the mechanics of patellofemoral contact. *Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 2010, vol. 92, no. 10, pp. 1466–1470. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.92b10.24221>
24. Scott C. E. H., Clement N. D., Yapp L. Z., MacDonald D. J., Patton J. T., Burnett R. Association between femoral component sagittal positioning and anterior knee pain in total knee arthroplasty a 10-year case-control follow-up study of a cruciate-retaining single-radius design. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2019, vol. 101, no. 17, pp. 1575–1585. <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.18.01096>
25. Kawahara S., Matsuda S., Fukagawa S., Mitsuyasu H., Nakahara H., Higaki H., Shimoto T., Iwamoto Y. Upsizing the femoral component increases patellofemoral contact force in total knee replacement. *Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 2012, vol. 94, no. 1, pp. 56–61. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.94b1.27514>
26. Dennis D. A., Kim R. H., Johnson D. R., Springer B. D., Fehring T. K., Sharma A. The John Insall award: control-matched evaluation of painful patellar Crepitus after total knee arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2011, vol. 469, no. 1, pp. 10–17. <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1485-3>

27. Hungerford D., Barry M. Biomechanics of the patellofemoral joint. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1979, no. 144, pp. 9–15. <https://doi.org/10.1097/00003086-197910000-00003>

28. Budhiparama N. C., Hidayat H., Novito K., Utomo D. N., Lumban-Gaol I., Nelissen R. G. H. H. Does circumferential patellar denervation result in decreased knee pain and improved patient-reported outcomes in patients undergoing nonre-surfaced, simultaneous bilateral TKA? *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2020, vol. 478, no. 9, pp. 2020–2033. <https://doi.org/10.1097/corr.0000000000001035>

29. Rand J. A., Gaffey T. A. Effect of electrocautery on fresh human articular cartilage. *Arthroscopy. Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 1985, vol. 1, no. 4, pp. 242–246. [https://doi.org/10.1016/s0749-8063\(85\)80091-8](https://doi.org/10.1016/s0749-8063(85)80091-8)

30. Bindelglass D. F., Cohen J. L., Dorr L. D. Patellar tilt and subluxation in total knee arthroplasty. Relationship to pain, fixation, and design. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1993, no. 286, pp. 103–109. <https://doi.org/10.1097/00003086-199301000-00016>

31. Berger R. A., Crossett L. S., Jacobs J. J., Rubash H. E. Malrotation causing patellofemoral complications after total knee arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998, no. 356, pp. 144–153. <https://doi.org/10.1097/00003086-199811000-00021>

32. Kohl S., Evangelopoulos D. S., Hartel M., Kohlhof H., Roeder C., Egli S. Anterior knee pain after total knee arthroplasty: does it correlate with patellar blood flow? *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2011, vol. 19, no. 9, pp. 1453–1459. <https://doi.org/10.1007/s00167-011-1418-z>

33. Chester R., Smith T. O., Sweeting D., Dixon J., Wood S., Song F. The relative timing of VMO and VL in the aetiology of anterior knee pain: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2008, vol. 9, no. 1, art. 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-9-64>

Информация об авторе

Эйсмонт Олег Леонидович – д-р мед. наук, доцент, заместитель директора по научной работе. Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии (ул. Кизhevатова, 60/4, 220024, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: oleismont@tut.by

Information about the author

Oleg L. Eismont – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Deputy director of scientific work. Republican Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics (60/4, Kizhevato Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oleismont@tut.by

С. Д. Федянин

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Республика Беларусь*

РАЦИОНАЛЬНАЯ АНТИМИКРОБНАЯ ТЕРАПИЯ И СТИМУЛЯЦИЯ РАНЕВОГО ЗАЖИВЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Аннотация. Цель исследования – разработать эффективные метод и схему комплексного лечения хирургических инфекций кожи и мягких тканей (ХИКМТ).

Исследования выполнены у 201 пациента с ХИКМТ, которые находились на лечении в отделении гнойной хирургии клиники госпитальной хирургии УО «Витебский государственный медицинский университет» в 2017–2020 гг. Разработаны: протокол рационального применения антибиотиков у пациентов с ХИКМТ, эффективная схема применения антисептических лекарственных средств, метод лечения гнойных ран аутологичными аспиратами костного мозга.

За 13 лет исследований отмечаются существенные изменения в этиологической структуре грамотрицательных проблемных возбудителей у пациентов с гнойными ранами. Примерно в 8 раз (на 12,25 %; $p < 0,05$) увеличилась доля *K. pneumoniae*, в 9 раз (на 14,69 %; $p < 0,05$) – *A. baumannii*. Доля метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA) практически не изменилась. Значительно увеличилась резистентность проблемных микроорганизмов практически ко всем антибактериальным лекарственным средствам. При ХИКМТ, вызванных MRSA, в качестве препарата выбора необходимо рекомендовать гликопептиды (ванкомицин), а в качестве резерва – оксазолидиноны (линезолид) и глицилциклины (тигециклин); при *K. pneumoniae* – колистат и тигециклин; при *P. aeruginosa* – карбапенемы (дорипенем) и колистат; при *A. baumannii* – пенициллины или цефалоспорины с сульбактамом (ампициллин + сульбактам) и колистат соответственно.

Установлено, что наибольшей активностью в отношении ведущих представителей микрофлоры гнойных ран обладают септомирин и 0,02 %-ный хлоргексидина биглюконат. При совместном их применении бактериальная обсемененность ран снижалась ниже критического уровня уже на 2-е сутки после хирургической обработки ($p < 0,01$).

Для стимуляции раневого заживления выполняли стерноцентез и забирали аутомиелоаспират. Производили кюретаж раны, аспират вводили в края раны и наносили на раневую поверхность. Установлено, что альтернативным источником красного костного мозга наряду с тазовыми костями может быть грудина. Объем полученного при стеральной пункции миелоасpirата варьировался от 10 до 140 мл. Разработанный метод позволяет достоверно сократить длительность второй фазы раневого процесса на 7 дней ($p < 0,01$).

Ключевые слова: резистентность, гнойная рана, стафилококк, псевдомонада, клебсиелла, ацинетобактер, антисептик, аутологичный аспират костного мозга

Для цитирования: Федянин, С. Д. Рациональная антимикробная терапия и стимуляция раневого заживления у пациентов с хирургической инфекцией / С. Д. Федянин // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 169–176. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-169-176>

Siarhei D. Fedzianin

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

RATIONAL ANTIMICROBIAL THERAPY AND WOUND HEALING STIMULATION IN PATIENTS WITH SURGICAL INFECTION

Abstract. The objective of the study was to develop the problem of complex treatment of surgical infections of the skin and soft tissues (SISST).

The studies were carried out in 201 patients with SISST who were treated at the Department of Purulent Surgery of the Hospital Surgery Clinic of the EE “Vitebsk State Medical University” in 2017–2020. As a result, it was developed: a protocol for a rational use of antibiotics in the patients with SISST, an effective regimen for use of antiseptic drugs, a method for treating purulent wounds with autologous bone marrow aspirates.

For 13 years, there have been significant changes in the etiological structure of gram-negative problematic pathogens in patients with purulent wounds. The share of *K.pneumoniae* increased approximately 8 times (by 12.25 %; $p < 0.05$), and *A.baumannii* – 9 times (by 14.69 %; $p < 0.05$). The share of MRSA remained virtually unchanged. The resistance of problem

microorganisms to almost all antibacterial drugs significantly increased. For MRSA-induced SISST, glycopeptides (vancomycin) should be recommended as a drug of choice, and oxazolidinones (linezolid) and glycylicyclines (tigecycline) should be recommended as a reserve; *K. pneumoniae* – colistat and tigecycline; *P. aeruginosa* – carbapenems (doripenem) and colistat; *A. baumannii* – penicillins or cephalosporins with sulbactam (ampicillin + sulbactam) and colistat.

It was found that septomyrin and 0.02 % chlorhexidine bigluconate have the greatest activity against the leading representatives of the microflora of purulent wounds. With a combined use of septomirin and chlorhexidine, the bacterial contamination of wounds decreased below the critical level already on the 2nd day after surgical treatment ($p < 0.01$).

To stimulate wound healing, sternocentesis is performed and automyeloaspirate is taken. The curettage of the wound and the aspirate introduction into the wound edges and the application to the wound surface are performed. It has been established that, along with the pelvic bones, the sternum can be an alternative source of red bone marrow. The myeloaspirate volume obtained by sternal puncture varied from 10 to 140 ml. The developed method allows us to reliably reduce the duration of the 2 phase of the wound process by 7 days ($p < 0.01$).

Keywords: resistance, purulent wound, staphylococcus, pseudomonas, klebsiella, acinetobacter, antiseptic, autologous bone marrow aspirate

For citation: Fedzianin S. D. Rational antimicrobial therapy and wound healing stimulation in patients with surgical infection. *Vestsi Natsyonal'nei akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 169–176 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-169-176>

Введение. Несмотря на значительные успехи в клинической медицине, проблема оказания помощи пациентам с хирургическими инфекциями кожи и мягких тканей (ХИКМТ) остается актуальной, что требует привлечения значительного объема финансовых средств. На современном этапе доля хирургических инфекций может достигать порядка 40 % в общей структуре хирургических болезней, причем первое место отводится ХИКМТ. Примерно 65–70 % пациентов, которые обращаются за хирургической помощью, страдают ХИКМТ, 75 % пациентов с данной патологией трудоспособного возраста. Средние сроки госпитализации составляют 20–25 койко-дней. Внутрибольничное инфицирование с развитием ХИКМТ наблюдается примерно в 35 % случаев [1, 2], летальные исходы – примерно в 5 % случаев.

Состав микроорганизмов, вызывающих ХИКМТ, характеризуется не только большим разнообразием, но и наличием микробных ассоциаций. Стафилококк, коагулазоотрицательный стафилококк (КОС), энтерококк, кишечная палочка, синегнойная палочка и энтеробактер чаще всего вегетируют на поверхности ран с учетом облигатных анаэробов. У амбулаторных и госпитализированных пациентов лидирующие позиции могут занимать представители семейства *Enterobacteriaceae* (60,8 %). Среди них кишечная палочка встречается примерно в 30,6 % случаев, клебсиелла – в 25,7 % [2].

Самой уязвимой категорией являются пациенты старше 70 лет. На фоне бактериальной инфекции у них значительно усугубляется течение хронической патологии, которая, как правило, приводит к смертельному исходу [3].

С развитием антибиотикорезистентности изменялся и этиологический состав микроорганизмов. Стали появляться микробные ассоциации. В начале 1950-х годов доля стрептококков уменьшилась и лидирующие позиции занял род *Staphylococcus*, составлявший около 70 % структуры патогенов. На долю грамотрицательной микрофлоры приходилось 25–30 % [3].

Неадекватное, а иногда и иррациональное применение противомикробных препаратов, в частности цефалоспоринов третьего поколения, снижало количество грамотрицательной микрофлоры, способствуя увеличению в этиологической структуре ХИКМТ доли стафилококка и стрептококка. С увеличением числа пациентов с тяжелыми хирургическими инфекциями и сепсисом в конце 1990-х годов выросла и частота инфекций, вызванных кокками с лекарственной устойчивостью [1, 2, 4].

В настоящее время в стационарах и поликлиниках продолжают лидировать микробные инфекции, вызванные грамположительной микрофлорой – стафилококками стрептококками, энтерококками, среди которых преобладают золотистый стафилококк и *S. pyogenes*, на долю которых приходится более 50 % [4–6].

Пациенты с сахарным диабетом имеют низкую устойчивость к вирусным, грибковым и бактериальным инфекциям, которые особенно опасны и часто смертельны. В микробных ассоциациях, выделяемых из ран, присутствуют золотистый стафилококк (35 %), КОС, энтеробактерии.

В процессе нахождения в стационаре происходит смена грамположительной микрофлоры на грамотрицательную. Синегнойная палочка присутствует в посевах в 3,7 % случаев и появляется на 4–5-й неделе госпитализации [4, 7, 8].

Резистентность к антибактериальным и антисептическим лекарственным средствам весьма распространена в стационарах и амбулаториях стран Европы. Это часто приводит к внутригоспитальному инфицированию с развитием тяжелых осложнений, вплоть до летального исхода. *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp.* в настоящее время характеризуются множественной резистентностью к антимикробным лекарственным средствам, включая препараты группы карбапенемов. Достаточно распространенным явлением стала панрезистентность [4, 7, 8].

В разных стационарах микробиота отличается уровнем антибиотикоустойчивости, а иногда и этиологической структурой и резистентностью. В клинической практике все чаще стали использоваться фторхинолоны, карбапенемы, цефалоспорины 3–4-го поколений, что приводит к росту устойчивости к ним клинически значимых микроорганизмов [1–3].

В настоящее время разработаны и внедрены в практическое здравоохранение новые эффективные антисептики с широким спектром антимикробной активности. Но ряд «старых» лекарственных средств по-прежнему характеризуется мощным воздействием на микробиоту. Для местного лечения гнойных ран достаточно давно в клинической практике применяется 3 %-ный раствор перекиси водорода, 0,02 %-ный раствор хлоргексидина биглюконата, диоксидин. Данные антисептические лекарственные средства и сегодня обладают мощным воздействием на микробиоту. Достаточно широко используются антисептики, разработанные позже, такие как септомирин (мирамистин) и мукосанин [4, 9].

При лечении пациентов с ХИКМТ особую сложность представляет заживление обширных ран и хронических раневых дефектов. Ресурс использования многочисленных стандартных методик практически исчерпан. Требуется разработка и внедрение инновационных подходов для стимулирования регенераторных механизмов в измененных патологическим процессом тканях. Для стимуляции раневого заживления применяются культивированные фибробласты, культуры аутологичных мезенхимальных стволовых клеток пациентов. Но высокая цена на клеточные культуральные методики, необходимость наличия специального оборудования и расходных материалов обуславливают невозможность применения данных методик на уровне базового звена системы здравоохранения. Весьма перспективными представляются методы трансплантации аутологичных материалов, содержащих различные типы клеток-предшественниц, обладающих высоким регенераторным потенциалом. Наиболее доступным источником мультипотентных стромальных клеток является красный костный мозг. Аспират костного мозга включает популяцию стволовых клеток, обладающих не только высокими возможностями регенерации, но и иммунорегуляторным, гемопоэтическим действием, способностью к пролиферации и дифференцировке в различные клетки. Доказано, что в результате их применения происходит стимуляция регенераторных процессов [10–12].

Таким образом, проблема лечения ХИКМТ является весьма актуальной и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования – разработать эффективные метод и схему комплексного лечения хирургических инфекций кожи и мягких тканей.

Задачи исследования:

1. Изучить резистентность проблемных микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам и разработать протокол рационального применения антибиотиков у пациентов с ХИКМТ.

2. Разработать эффективную схему применения антисептических лекарственных средств у пациентов с ХИКМТ.

3. Разработать метод лечения гнойных ран у пациентов с ХИКМТ аутологичными аспиратами костного мозга и оценить его эффективность.

Материалы и методы исследования. В исследование был включен 201 пациент с ХИКМТ, проходивший лечение в отделении гнойной хирургии клиники госпитальной хирургии УО «Витебский государственный медицинский университет» в 2017–2020 гг.

Бактериологические исследования выполнены у 129 пациентов. Для сравнения использованы результаты мониторинга микрофлоры у 92 пациентов с ХИКМТ, находившихся на лечении в клинике в 2006–2007 гг.

Исследования по лечению ран аутологичными аспиратами костного мозга выполнено у 72 пациентов с ХИКМТ.

В основную группу вошли 37 пациентов (20 (54,05 %) женщин и 17 (45,95 %) мужчин, средний возраст – $63,76 \pm 2,6$ года) с обширными и хроническими ранами, у которых наряду с традиционным комплексным лечением применялся разработанный нами метод. Площадь ран составляла $88,67 \pm 8,04$ см². Средний объем вводимого аутомиелоасpirата – $34,46 \pm 3,23$ мл. У 27 (72,97 %) пациентов площадь раневых дефектов была обширной (более 50 см²). Хронизация раневого процесса происходила на фоне сахарного диабета (17 (45,95 %) случаев) и облитерирующего атеросклероза нижних конечностей (7 (18,92 %) случаев).

Контрольная группа включала 35 пациентов (18 (51,43 %) женщин и 17 (48,57 %) мужчин, средний возраст – $64,9 \pm 2,5$ года) с обширными и хроническими ранами, которые получали традиционное комплексное лечение. Площадь ран составляла $85,68 \pm 10,07$ см². У 29 (82,86 %) пациентов площадь раневых дефектов была обширной (более 50 см²). Хронизация раневого процесса происходила на фоне сахарного диабета (18 (51,43 %) случаев) и облитерирующего атеросклероза нижних конечностей (5 (14,29 %) случаев).

На фоне сахарного диабета раневой процесс на нижних конечностях протекал у 15 (40,5 %) пациентов основной группы и у 9 (25,71 %) лиц контрольной группы. У всех пациентов выявлена хроническая артериальная недостаточность (ХАН) III–IV стадии по классификации Покровского–Фонтейна.

У 7 (18,92 %) пациентов основной группы и у 5 (14,29 %) контрольной с облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей выявлена ХАН III–IV стадии.

В работе использованы стандартные методы бактериологии. Для выделения стафилококков применяли желточно-солевой агар, для выделения энтеробактерий и псевдомонад – среду Эндо и питательный агар с цетилперидиниум-хлоридом соответственно.

Видовую принадлежность определяли в автоматическом режиме на биохимическом анализаторе АТВ Expression bioMerieux с использованием тест-систем: ID 32 STAPH – для стафилококков, ID 32 E – для энтеробактерий, ID 32 GN – для грамотрицательных палочек.

Резистентность микроорганизмов определяли в автоматическом режиме на биохимическом анализаторе АТВ Expression bioMerieux с использованием тест-систем АТВ STAPH (для стафилококков), АТВ PSE (для псевдомонад), rapid АТВ E (для энтеробактерий) и разработанных нами тест-систем АБ-СТАФ, АБ-ПСЕВ, АБ-ЭНТЕР, АБ-ГРАМ (для стафилококков, псевдомонад, энтеробактерий и грамотрицательной микрофлоры).

Для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антисептиков применяли серийный метод разведений в жидкой питательной среде. МПК₅₀ и МПК₉₀ определяли с помощью построения графической модели.

Площадь ран оценивали по методике А. Н. Лызикова (2008). Для этого источник света (фонарь) с разлинеенной квадратами прозрачной насадкой располагали на фиксированном расстоянии от листа миллиметровой бумаги и определяли площадь квадрата сетки путем свечения. Затем квадраты проецировали на раневой дефект, причем фонарь располагали от него на таком же расстоянии, как при калибровке. Площадь раневого дефекта определяли путем подсчета световых квадратов на ране. Определение скорости раневого заживления выполняли с помощью формулы, предложенной Л. Н. Поповой.

Статистическую обработку полученных данных производили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 и Microsoft Office Excel 2016. Для оценки равномерности распределения рассчитывали показатель Шапиро–Уилка.

Результаты выражали в виде среднего арифметического показателя \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$), а также в виде медианы с первым и третьим квартилями – Me (LQ; UQ). Для оценки достоверности различий использовали U -критерий Манна–Уитни. За критерий достоверности принимали величину $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В структуре возбудителей ХИКМТ в настоящее время лидируют стафилококки (42,68 %), энтеробактерии (26,23 %), неферментирующие грамотрицательные палочки (НГОП), представленные *A. baumannii* (16,46 %), *P. aeruginosa* (14,63 %) (рис. 1).

Из семейства стафилококков преобладали *S. aureus* (34,15 %) и КОС, представленные эпидермальным стафилококком (8,54 %), из энтеробактерий – виды *K. pneumoniae* (14,02 %), *P. mirabilis* (6,71 %), *E. coli* (5,49 %).

За последние 13 лет доля стафилококков в этиологической структуре раневой инфекции достоверно уменьшилась на 13,96 % ($p < 0,05$). Отмечался незначительный рост удельного веса MRSA. Так, на его долю в 2007 г. приходилось 92 % изолятов золотистого стафилококка, а в 2020 г. – 94 % ($p > 0,05$).

За время проведения мониторинга наблюдалось достоверное увеличение резистентности MRSA к клиндамицину – 86,67 %, офлоксацину – 100 % ($p < 0,05$). В качестве препарата выбора можно рекомендовать гликопептиды (ванкомицин), а в качестве резерва – оксазолидиноны (линезолид) и глицилциклины (тигекцилин). В отношении данных препаратов MRSA обладает абсолютной чувствительностью.

В 2006–2007 гг. на долю энтеробактерий, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* в структуре возбудителей раневой инфекции приходилось 21,24; 13,27 и 1,77 % соответственно.

За время мониторинга отмечались существенные изменения в этиологической структуре грамотрицательных проблемных возбудителей у пациентов с гнойными ранами. Примерно в 8 раз (на 12,25 %; $p < 0,05$) увеличилась доля *K. pneumoniae*, в 9 раз (на 14,69 %; $p < 0,05$) – *A. baumannii*.

За 13 лет *K. pneumoniae* приобрела практически панрезистентность. Уровень ее устойчивости колебался от 72,73 до 100 %. Низкая резистентность отмечалась к колистату (0 %) и тигекцилину (8,33 %). В качестве препарата выбора следует использовать полимиксины (колистат), а в качестве резерва – глицилциклины (тигекцилин).

Синегнойная палочка характеризовалась высоким уровнем резистентности, включая имипенем и меропенем (100 % резистентных изолятов). В группе карбапенемов сохранял активность дорипенем (45,45 % устойчивых изолятов). При отсутствии чувствительности к карбапенемам в качестве препарата резерва можно рекомендовать колистат (0 % резистентных изолятов).

За время мониторинга ацинетобактер приобрел резистентность к амикацину (85,71 %), карбапенемам (80–100 %), фторированным хинолонам (83–100 %). В качестве препарата выбора можно рекомендовать пенициллины или цефалоспорины с сульбактамом – ампициллин + сульбактам (резистентность 0 %), а в качестве резерва – колистат (резистентность 0 %).

На основании данных проведенного мониторинга резистентности разработан протокол терапии ХИКМТ, вызванных проблемными микроорганизмами (см. таблицу).

При применении антибиотиков согласно протоколу выделение микроорганизмов из ран прекращалось.

Для изолятов стафилококков величина МПК₉₀ септомирина составила 16 мкг/мл; мукосанина – 80; 3 %-ной перекиси водорода – 114,5; 0,02 %-ного хлоргексидина биглюконата – 22,1; диоксидина – 120,75 мкг/мл.

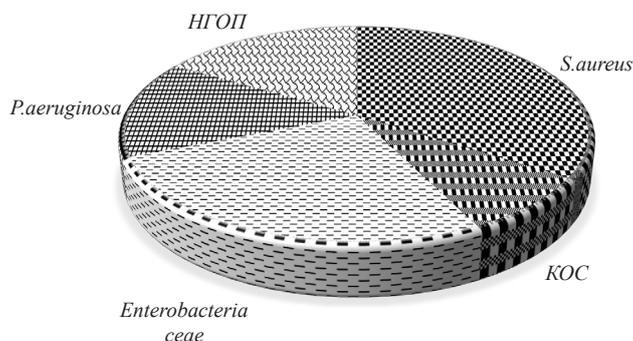


Рис. 1. Структура возбудителей у пациентов с ХИКМТ

Fig. 1. Pathogen structure in the patients with surgical skin and soft tissue infections

Протокол терапии ХИКМТ, вызванных проблемными микроорганизмами
Treatment protocol of the surgical skin and soft tissue infections due to problem microorganisms

Микроорганизм	Антибиотик выбора	Антибиотик резерва
MRSA	Ванкомицин	Линезолид, тигециклин
<i>K. pneumoniae</i>	Колистат	Тигециклин
<i>P. aeruginosa</i>	Карбапенемы (дорипенем)	Колистат
<i>A. baumannii</i>	Пенициллины или цефалоспорины с сульбактамом (ампициллин + сульбактам)	Колистат

Для изолятов энтеробактерий величина МПК₉₀ септомирина составила 15,2 мкг/мл; муко-санина – 31; 3 %-ной перекиси водорода – 102,6; 0,02 %-ного хлоргексидина биглюконата – 28; диоксида – 78,13 мкг/мл.

Для изолятов *P. aeruginosa* величина МПК₉₀ септомирина составила 32 мкг/мл; муко-санина – 102,6; 3 %-ной перекиси водорода – 119; 0,02 %-ного хлоргексидина биглюконата – 48; диокси-дина – 112,5 мкг/мл.

Установлено, что в нашем регионе наибольшей активностью в отношении ведущих пред-ставителей микрофлоры гнойных ран обладают септомирин и 0,02 %-ный хлоргексидина би-глюконат. При совместном их применении бактериальная обсемененность ран снижалась ниже критического уровня уже на 2-е сутки после хирургической обработки ($p < 0,01$), в то время как при использовании септомирина и хлоргексидина по отдельности – только на 5-е ($p < 0,01$) и 6-е ($p < 0,01$) сутки соответственно.

Нами разработан метод лечения гнойных ран у пациентов с ХИКМТ аутологичными аспи-ратами костного мозга.

Вначале производили периоперационную антибиотикопрофилактику. Затем в условиях опе-рационной под местной анестезией 1 %-ным раствором лидокаина иглой И. А. Кассирского осу-ществляли стерильную пункцию в месте прикрепления 3–4-го ребра по передней срединной линии и аспирировали красный костный мозг. Костный мозг смешивали в шприце в соотноше-нии 10:1 с раствором, состоящим из 0,9 % хлорида натрия и гепарина 5000 ед/мл в соотношении 10:1. Производили кюретаж раны ложкой Фолькмана. Аспират костного мозга вводили в края раны и наносили на раневую поверхность. Поверх клали марлевые салфетки. Процедуру выпол-няли однократно при нарушении процессов регенерации во второй фазе раневого процесса.

На рис. 2–5 представлена методика забора и введения аутомиелоаспирата.

Наши исследования показали, что альтернативным источником красного костного мозга на-ряду с тазовыми костями может быть грудина. Объем полученного при стерильной пункции миелоаспирата варьировался от 10 до 140 мл. Для стимуляции раневого заживления производи-ли забор костного мозга (в среднем $35,83 \pm 3,13$ мл).



Рис. 2. Забор аутомиелоаспирата из грудины
 Fig. 2. Automyeloaspirate collection from the sternum



Рис. 3. Забранный аутомиелоаспират
 Fig. 3. Collected automyeloaspirate



Рис. 4. Кюретаж раны ложкой Фолькмана

Fig. 4. Curettage of the wound with a Folkmann spoon



Рис 5. Введение аутомиелоасpirата

Fig. 5. Automyeloaspirate injection

При выполнении стеральной пункции и при введении аутомиелоасpirата в мягкие ткани осложнений не было.

Площадь ран в основной группе до введения аутомиелоасpirата в среднем составила $88,67 \pm 8,04 \text{ см}^2$, а на момент выполнения пластического закрытия – $60,4 \pm 6,91 \text{ см}^2$.

Площадь ран в контрольной группе в начале второй фазы раневого процесса в среднем составила $85,68 \pm 10,07 \text{ см}^2$, а на момент выполнения пластического закрытия – $71,23 \pm 8,4 \text{ см}^2$.

Скорость заживления раны в основной группе составила $6,2 \pm 0,13 \%$ в день, а в контрольной группе – $3,38 \pm 0,07 \%$ в день и была в 1,83 раза достоверно выше при применении аутомиелоасpirата ($p < 0,01$).

Длительность фазы формирования и созревания грануляционной ткани в основной группе составила 5,0 (LQ 3,0; UQ 7,0) дня, в контрольной – 12,0 (LQ 9,0; UQ 15,0) ($p < 0,01$).

Выводы

1. При ХИКМТ, вызванных MRSA, в качестве препарата выбора можно рекомендовать гликопептиды (ванкомицин), а в качестве резерва – оксазолидиноны (линезолид) и глицилциклины (тигекцилин); при *K. pneumoniae* – колистат и тигекцилин; при *P. aeruginosa* – карбапенемы (дори-пенем) и колистат; при *A. baumannii* – пенициллины или цефалоспорины с сульбактамом (ампициллин + сульбактам) и колистат соответственно.

2. Обработка ран комбинацией септомирин с 0,02 %-ным раствором хлоргексидина биглюконата при лечении ХИКМТ эффективна в первую фазу раневого процесса.

3. Разработанный метод лечения гнойных ран у пациентов с ХИКМТ, основанный на применении аутологичных аспиратов костного мозга, легко осуществим технически, что позволяет достоверно сократить длительность второй фазы раневого процесса на 7 дней.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках проекта «Разработать метод стимуляции раневого заживления» Государственной программы научных исследований (№ 20200229 от 24.02.2020 г.).

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the project “To develop a method for stimulating wound healing” of the State Program of Scientific Study (No. 20200229 dated February 24, 2020).

Список использованных источников

1. Сепсис: классификация, клинко-диагностическая концепция и лечение / С. Ф. Багненко [и др.] ; под ред. Б. Р. Гельфанда. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Мед. информ. агентство (МИА), 2017. – 406 с.
2. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей : российские национальные рекомендации / Б. Р. Гельфанд [и др.] ; Рос. о-во хирургов и [др.]. – 2-е перераб. и доп. изд. – М. : Мед. информ. агентство (МИА), 2015. – 109 с.
3. Стратегия и тактика рационального применения антимикробных средств в амбулаторной практике: Евразийские клинические рекомендации / Б. А. Абеуова [и др.] ; под ред. С. В. Яковлева [и др.]. – М. : Пре100 Принт, 2016. – 144 с.

4. Trend of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and the remaining therapeutic options: a multicenter study in Tehran, Iran over a 3-year period / S. Jasemi [et al.] // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2016. – Vol. 63, N 6. – P. 466–472. <https://doi.org/10.1111/lam.12669>
5. Mukhopadhyay, C. Infection control in intensive care units / C. Mukhopadhyay // *Indian J. Respir. Care.* – 2018. – Vol. 7, N 1. – P. 14–21. https://doi.org/10.4103/ijrc.ijrc_9_17
6. Лазарева, И. В. Распространение и антибактериальная резистентность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, в Санкт-Петербурге и некоторых других регионах Российской Федерации / И. В. Лазарева [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2016. – Т. 61, № 11–12. – С. 28–38.
7. Косинец, А. Н. Инфекция в хирургии / А. Н. Косинец, В. А. Косинец, Ю. В. Стручков. – Минск : Беларус. энцыкл. імя П. Броўкі, 2012. – 496 с.
8. Hamprecht, A. Treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae / A. Hamprecht, S. Göttig // *Curr. Treat. Options Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 6, N 4. – P. 425–438. <https://doi.org/10.1007/s40506-014-0029-x>
9. Применение антисептических лекарственных средств в здравоохранении на фоне резистентности микроорганизмов к антибиотикам и современная инновационная разработка компании «БелАсептика» – «Мукосанин» [Электронный ресурс]. – Беласептика, 2018. – Режим доступа: <https://belaseptika.by/know/the-use-of-antiseptic-drugs-in-health-care-against-the-background-of-resistance-of-microorganisms-to/>. – Дата доступа: 21.04.2020.
10. Дрюк, Н. Ф. Применение аутологичных аспиратов, а также мультипотентных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани в сосудистой хирургии / Н. Ф. Дрюк [и др.] // *Клін. хірургія.* – 2012. – № 12. – С. 24–29.
11. Badiavas, E. V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells / E. V. Badiavas, V. Falanga // *Arch. Dermatol.* – 2003. – Vol. 139, N 4. – P. 510–516. <https://doi.org/10.1001/archderm.139.4.510>
12. Autologous bone marrow aspirate therapy for skin tissue engineering and tissue regeneration / G. J. Gupta [et al.] // *Adv. Wound Care.* – 2017. – Vol. 6, N 4. – P. 135–142. <https://doi.org/10.1089/wound.2016.0704>

References

1. Gel'fand B. R. (ed.). *Sepsis: classification, clinical and diagnostic concept and treatment. 4th ed.* Moscow, Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo (MIA) Publ., 2017. 406 p. (in Russian).
2. Gel'fand B. R., Kubyskin V. A., Kozlov R. S., Khachatryan N. N. *Surgical infections of the skin and soft tissues: Russian national guidelines. 2nd ed.* Moscow, Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo (MIA) Publ., 2015. 109 p. (in Russian).
3. Yakovlev S. V., Rafal'skii V. V., Sidorenko S. V., Spichak T. V. (eds.). *Strategy and tactics of the rational use of antimicrobial agents in outpatient practice: Eurasian clinical guidelines.* Moscow, Prel00 print Publ., 2016. 144 p. (in Russian).
4. Jasemi S., Douraghi M., Adibhesami H., Zeraati H., Rahbar M., Boroumand M. A., Aliramezani A., Ghourchian S., Mohammadzadeh M. Trend of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and the remaining therapeutic options: a multicenter study in Tehran, Iran over a 3-year period. *Letters in Applied Microbiology*, 2016, vol. 63, no. 6, pp. 466–472. <https://doi.org/10.1111/lam.12669>
5. Mukhopadhyay C. Infection control in intensive care units. *Indian Journal of Respiratory Care*, 2018, vol. 7, no. 1, pp. 14–21. https://doi.org/10.4103/ijrc.ijrc_9_17
6. Lazareva I. V., Ageevets V. A., Ershova T. A., Zueva L. P., Goncharov A. E., Dar'ina M. G., Svetlichnaya Yu. S., Uskov A. N., Sidorenko S. V. Prevalence and antibacterial resistance of carbapenemase-producing gram-negative bacteria in Saint Petersburg and some other regions of the Russian Federation. *Antibiotiki i khimioterapiya* [Antibiotics and chemotherapy], 2016, vol. 61, no. 11–12, pp. 28–38 (in Russian).
7. Kosinets A. N., Kosinets V. A., Struchkov Yu. V. *Infection in surgery.* Minsk, Belaruskaya entsyklopedyya imya Petrusya Brouki Publ., 2012. 496 p. (in Russian).
8. Hamprecht A., Göttig S. Treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 2014, vol. 6, no. 4, pp. 425–438. <https://doi.org/10.1007/s40506-014-0029-x>
9. *The use of antiseptic drugs in health care against the background of resistance of microorganisms to antibiotics and the modern innovative development of BelAseptika – Mukosanin.* Available at: <https://belaseptika.by/know/the-use-of-antiseptic-drugs-in-health-care-against-the-background-of-resistance-of-microorganisms-to/> (accessed 21.04.2020) (in Russian).
10. Dryuk N. F., Kirimov V. I., Barna I. E., Dmitrenko I. P., Shkuropat V. N. The use of autologous aspirates, as well as multipotent stromal cells of bone marrow and adipose tissue in vascular surgery. *Klinichna khirurgiya* [Clinical surgery], 2012, no. 12, pp. 24–29 (in Russian).
11. Badiavas E. V., Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Archives of Dermatology*, 2003, vol. 139, no. 4, pp. 510–516. <https://doi.org/10.1001/archderm.139.4.510>
12. Gupta G. J., Karki K., Jain P., Saxena A. K. Autologous bone marrow aspirate therapy for skin tissue engineering and tissue regeneration. *Advances in Wound Care*, 2017, vol. 6, no. 4, pp. 135–142. <https://doi.org/10.1089/wound.2016.0704>

Информация об авторе

Федянин Сергей Дмитриевич – канд. мед. наук, доцент. Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210009, г. Витебск, Республика Беларусь). E-mail: fedyanin-1977@mail.ru

Information about the author

Siarhei D. Fedzianin – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (27, Frunze Ave., 210009, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: fedyanin-1977@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.34-002-08:602.9]-092.9-036.8

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-177-185>

Поступила в редакцию 11.01.2021

Received 11.01.2021

**А. Ю. Адамович¹, Д. Б. Нижегородова¹, В. К. Шадрина¹, О. Г. Дыбов¹,
А. М. Старостин¹, Т. Э. Владимирская¹, А. В. Воробей¹, М. М. Зафранская²**

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

²Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

Аннотация. Дисрегуляция врожденного и адаптивного иммунитета является центральным механизмом патогенеза воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), к которым относятся болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК). Учитывая иммуномодулирующие свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), перспективным направлением представляется разработка новых патогенетических подходов к лечению ВЗК с использованием клеточной терапии.

Изучено влияние ММСК при их внутриартериальном и внутривенном введении на цитокин-продуцирующую функцию моноцитов/макрофагов *in vitro* и на пролиферативную активность спленоцитов лабораторных животных с экспериментальным ВЗК в условиях неспецифической и специфической (использование маннана – компонента клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) стимуляции.

Показано, что культуры ММСК оказывают иммуномодулирующее действие на фоне улучшения клинических, морфометрических показателей и патоморфологической картины повреждения при экспериментальном ВЗК. Внутриартериальное и внутривенное введение клеточных культур в разной степени снижало маннан-индуцированную продукцию ФНО- α CD68⁺-клетками и митоген/маннан-стимулированную пролиферацию спленоцитов, что подтверждает иммуносупрессивное действие культур ММСК на аутореактивные клоны спленоцитов при экспериментальном ВЗК. Полученные результаты свидетельствуют о противовоспалительном эффекте клеточной терапии при экспериментальном моделировании ВЗК и являются обоснованием для комбинированного введения культур ММСК.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, воспалительные заболевания кишечника, экспериментальная модель, иммуномодуляция

Для цитирования: Иммуномодулирующий эффект клеточной терапии на экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника / А. Ю. Адамович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 177–185. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-177-185>

**Hanna Y. Adamovich¹, Darya B. Nizheharodava¹, Viktoriya K. Shadryna¹, Aleh G. Dybau¹,
Andrei M. Starastin¹, Tat'yana E. Vladimirskaia¹, Aliaksandr U. Varabei¹, Marina M. Zafranskaya²**

¹Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF CELL THERAPY ON THE EXPERIMENTAL INFLAMMATORY BOWEL DISEASE MODEL

Abstract. Dysregulation of innate and adaptive immunity is a central mechanism in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD) that include Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Given the immunomodulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs), developing new pathogenetic approaches to the IBD treatment using cell therapy seems to be promising.

In this article, the effect of intra-arterial and intravenous MMSCs on *in vitro* monocytes/macrophages cytokine-producing function and splenocytes proliferative activity in laboratory animals with experimental IBD under the conditions of non-specific and specific stimulation (mannan – cell wall component of *Saccharomyces cerevisiae* yeast) was studied.

MMSC cultures have been shown to possess an immunomodulatory effect against the background of improved clinical, morphometric parameters, and the pathomorphological picture of experimental IBD damage. Intra-arterial and intravenous administration of cell cultures decreased the mannan-induced TNF- α production by CD68⁺ cells and mitogen/mannan-stimulated splenocyte proliferation that confirms the immunosuppressive effect of MMSC cultures on autoreactive splenocyte clones in experimental IBD. The obtained results testify to the anti-inflammatory effect of cell therapy in the experimental modeling of IBD and justified a combined administration of MMSC cultures.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, inflammatory bowel diseases, experimental model, immunomodulation

For citation: Adamovich H. Yu., Nizheharodava D. B., Shadryna V. K., Dybau A. G., Starastin A. M., Vladimirskaia T. E., Varabei A. U., Zafranskaya M. M. Immunomodulatory effect of cell therapy on the experimental inflammatory bowel disease model. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 177–185 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-177-185>

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относят болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), представляют собой гетерогенную группу хронических аутоиммунных болезней, при которых в результате дисрегуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа на компоненты нормальной микрофлоры на фоне генетической предрасположенности и воздействия факторов окружающей среды поражается желудочно-кишечный тракт [1].

Показано, что нарушения имеются практически во всех звеньях иммунной системы кишечника, начиная от барьерных функций эпителия и распознавания антигена, передачи сигнала дендритными клетками и сигнальными молекулами, презентации антигена и заканчивая функциями моноцитов-макрофагов, Т- и В-лимфоцитов [2].

Врожденный иммунный ответ на кишечную микробиоту, опосредуемый двумя основными типами клеток – макрофагами и дендритными клетками, в настоящее время считается центральным звеном патогенеза ВЗК [3]. CD68⁺-моноциты и макрофаги, рекрутируемые в *lamina propria* кишки в воспаленных тканях, снижают уровни экспрессии белков плотного соединения, что приводит к нарушению целостности и сокращению функции кишечного эпителиального клеточного барьера, вызывая прогрессирование заболевания [4]. Макрофаги и дендритные клетки слизистой оболочки при ВЗК повышено экспрессируют TLR2 (toll-like receptor 2), TLR4, CD40 и хемокинового рецептора CCR7 (CC chemokine receptor 7), которые способствуют формированию воспаления, индуцируя выработку провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкин-1b (ИЛ-1b), ИЛ-6 и ИЛ-18 [5].

Изучение Т-клеток слизистой оболочки, а именно CD4⁺Th-лимфоцитов (Т helper), позволило установить конкретные механизмы иммунорегуляторной и эффекторной функций, а также характер секреции цитокинов при каждом из видов ВЗК [6, 7]. Так, при БК CD4⁺Th1- и CD4⁺Th17-клетки способствуют формированию провоспалительных макрофагов и экспрессируют различные провоспалительные цитокины (ИЛ-6, ИЛ-17A/F, ИЛ-21, ИЛ-22, CXCL8 (C-X-C motif ligand 8), интерферон- γ (ИФН- γ) и ФНО- α), вызывая инфильтрацию кишечных эпителиальных клеток и, как следствие, острый или хронический энтерит, в то время как CD4⁺Th2-клетки из *lamina propria* пациентов с ЯК характеризуются повышенной продукцией ИЛ-5, ИЛ-16, ИЛ-13 и ФНО- α [8].

Одним из наиболее активных цитокинов с провоспалительным действием является ФНО- α , который вырабатывается активированными макрофагами, моноцитами и Т-лимфоцитами. Увеличение уровня ФНО- α в слизистой оболочке кишечника и в образцах крови пациентов коррелирует с клинической активностью БК [8, 9]. ФНО- α вместе с ИФН- γ и ИЛ-1 опосредует реакцию замедленной гиперчувствительности и активацию макрофагов, что приводит к формированию гранулем при БК [2].

На сегодняшний день отсутствуют оптимальные протоколы лечения, направленные на селективное подавление специфических клонов лимфоцитов. Благодаря внедрению в медицинскую практику достижений фундаментальных исследований в области молекулярной и клеточной биологии появилась возможность разрабатывать новые способы лечения ВЗК с использованием различных типов стволовых и прогениторных клеток.

Наиболее перспективным и современным направлением является клеточная терапия мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК). Эти клетки могут мигрировать по принципу «хоуминга» в места повреждения, воспаления, секретируя большое количество растворимых трофических факторов, которые подавляют продукцию провоспалительных цитокинов и пролиферацию аутореактивных Т-клеток. Показано, что совместное культивирование ММСК с дендритными клетками приводит к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов (ИФН- γ , CD11c, CD80, CD86, ИЛ-6, ФНО- α) и к повышенной экспрессии противовоспалительных (CD11b, ИЛ-10, трансформирующий ростовой фактор- β (ТрФ- β)) цитокинов. Таким образом, ММСК способны воздействовать на врожденный и адаптивный иммунный ответ, секре-

тируя иммуномодулирующие компоненты, которые контролируют развитие воспаления посредством воздействия на дендритные клетки, макрофаги, Т-, В- и НК-лимфоциты [4, 10].

Несмотря на широкое использование стволовых клеток в клинической практике, данных о механизмах эффективного влияния клеточной терапии и об обоснованности применения клеточных культур для лечения ВЗК в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* недостаточно. До конца не определен оптимальный источник получения ММСК, необходимая терапевтическая доза, а также способ и кратность введения.

Экспериментальная модель ВЗК воспроизводит основные механизмы развития колита, что позволяет оценить влияние клеточных культур и обоснованно подойти к патогенетической терапии БК и ЯК у человека.

Цель исследования – оценить иммуномодулирующий эффект клеточной терапии с использованием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника.

Материалы и методы исследования. *Экспериментальное моделирование ВЗК.* Экспериментальную модель ВЗК индуцировали на белых лабораторных крысах линии Wistar ($n = 54$) массой 320–380 г. С целью очистки толстой и тонкой кишки крысы голодали в течение 48 ч до начала эксперимента, а за сутки до введения повреждающего вещества энтерально вводили 7,4 % раствора «Фордрайв» из расчета 6 мл на 100 г массы лабораторного животного [11]. Затем крысы были частично наркотизированы путем внутрибрюшинного введения тиопентала натрия и разделены на две группы. Животным опытной группы ($n = 39$) ректально вводили 90 мг/кг динитробензолсульфоновой кислоты в 250 мкл 50 %-ного этанола, крысам группы сравнения (ГС, $n = 15$) – ректально 250 мкл 50 %-ного этанола. Валидность модели подтверждали клинически, морфологически, макро- и микроскопически [12].

Для клинической оценки токсического повреждения использовали следующие параметры: активное время животного и количество актов дефекации за отведенное время, масса тела, загрязнение вокруг анального отверстия и консистенция стула. Кроме того, оценивали динамику потери массы тела лабораторных животных, используя следующую формулу:

$$\text{Потеря массы тела} = \frac{m_{\text{исх}} - m_{n \text{ сут}}}{m_{\text{исх}}} \cdot 100 \%,$$

где $m_{\text{исх}}$ – масса тела лабораторного животного до начала испытания, г; $m_{n \text{ сут}}$ – масса тела лабораторного животного на n -е сутки эксперимента, г.

После выведения из эксперимента оценивали массу селезенки лабораторного животного и отношение массы селезенки к массе тела (в %). У каждого животного удаляли дистальный сегмент толстой кишки размером 7 см, взвешивали и выражали в виде соотношения веса сегмента (г) к длине толстой кишки (см), оценивая таким образом соотношение массы толстой кишки к ее длине.

Получение и культивирование ММСК костного мозга (КМ). ММСК КМ выделяли из мононуклеарной фракции клеток КМ бедренных костей крыс ($n = 8$), полученной путем центрифугирования на градиенте плотности ROTI@Sep 1077 (Carl Roth, Германия). Суспензию мононуклеарных клеток после двукратного отмывания в фосфатном буферном растворе (ФБР) (Gibco, США) с добавлением 5 %-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Gibco, Великобритания) культивировали в чашках Петри в среде DMEM (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % ЭТС, 1 % L-глутамин (Gibco, Великобритания) и 1 % антибиотика-антимикотика (Gibco, США), при 37 °C и атмосфере с 5 % CO₂. Полную смену питательной среды осуществляли через сутки после посева, далее – каждые 3-и–4-е сутки.

При достижении первичной культурой субконфлюэнтности (75–90 %) клетки переводили в первый пассаж с использованием 0,025 %-ного раствора трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (Gibco, США). После отделения клеток от чашки фермент инактивировали путем добавления 5 %-ной ЭТС в ФБР, а затем двукратно отмывали (при 1500 об/мин в течение 10 мин). Далее клетки высевали в концентрации 10⁵/чашку в полную питательную среду. Культивирование в первом и последующих пассажах проводили так же, как в первичной культуре.

Инфузия ММСК КМ лабораторным животным с экспериментальным ВЗК. Предварительно подготовленные ММСК КМ вводили на 4-е сутки экспериментального моделирования. Использовали следующие способы введения: внутривенно (в/в, в хвостовую вену) – $1 \cdot 10^6$ кл/кг в 0,3 мл физиологического раствора; внутриартериально (в/а, брюшной отдел аорты, на 1 см ниже отхождения печеночных артерий) – $0,3 \cdot 10^6$ кл/кг в 0,1 мл физиологического раствора.

Морфологический метод исследования тонкой и толстой кишки экспериментальных животных. Отобранный образец кишки фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине в течение 48 ч. Затем промывали в проточной воде и в течение 24 ч обезживали в спиртах восходящей концентрации (70, 80, 96 %, абсолютный спирт). Далее материал проводили через спирт-ксилол, ксилол, ксилол-парафин и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Для изучения препаратов и изготовления микрофотографий использовали световой микроскоп Motic BA410E (Китай).

Метод проточной цитометрии. Предварительно выделенные на градиенте плотности спленоциты лабораторных крыс культивировали в концентрации $2 \cdot 10^5$ кл/лунку 96-луночного круглодонного планшета в среде DMEM, содержащей 1,0 мкг/мл конканавалина А (ConA) (Sigma, США) или 2 мкг/мл маннана (mannan) (Sigma, Германия) в течение 3 и 5 сут при 37 °С в атмосфере с 5 %-ным содержанием CO_2 . Спонтанную и стимулированную продукцию ФНО- α CD68⁺-клетками оценивали в 3-дневных культурах спленоцитов. Для количественного определения уровня внутриклеточной продукции ФНО- α за 4 ч до окончания культивирования добавляли 10 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (Sigma, Германия), 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина (Cauman Chemicals, США) и 10 мкг/мл брефелдина А (Cauman Chemicals, США), затем производили окрашивание моноклональными антителами к поверхностным маркерам моноцитов CD68-Alexa Fluor 647 (Bio-Rad, США) и дальнейшую фиксацию клеток в течение 10 мин 4 %-ным раствором параформальдегида в физиологическом растворе. После отмывания клеток путем центрифугирования в течение 5 мин при 1500 об/мин к суспензии добавляли моноклональные антитела ФНО α -PE (Beckman Coulter, США). Учет результатов производили с помощью проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter,).

Для оценки количества пролиферирующих спленоцитов клетки в концентрации $1 \cdot 10^7$ кл/мл перед культивированием окрашивали CFSE-препаратом (Sigma, Германия) в концентрации 7 мМ в 1 мл неполной культуральной среды RPMI-1640 (Sigma, Германия) в течение 5 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию окрашивания останавливали отмыванием клеток в холодной полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640 с 10 % ЭТС, 1 % L-глутамина и 1 % антибиотика-антимикотика. Регистрацию количества пролиферирующих и непролиферирующих спленоцитов осуществляли на 5-е сутки культивирования методом проточной цитофлуориметрии FC500 (Beckman Coulter, США).

Для определения степени ингибирующего влияния ММСК КМ на пролиферацию спленоцитов использовали следующую формулу расчета коэффициента супрессии (κ) [13, 14]:

$$\kappa = (100 - n_{\text{ВЗК} + \text{ММСК}} - n_{\text{ВЗК}}) \cdot 100,$$

где $n_{\text{ВЗК} + \text{ММСК}}$ – ConA-индуцированная пролиферация спленоцитов у животного с инфузией ММСК, %; $n_{\text{ВЗК}}$ – ConA-индуцированная пролиферация спленоцитов у животного с моделью ВЗК, %.

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных использовали пакет программ Statistica 8.0. Статистически значимые различия определяли при уровне $p < 0,05$. Для описательной статистики исследуемых групп использовали показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей ($Q = 0,25-0,75$). Сравнение групп и определение статистически значимых различий осуществляли с помощью непараметрического U -критерия Манна–Уитни для независимых переменных. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену с расчетом коэффициентов ранговой корреляции (R).

Результаты и их обсуждение. *Влияние клеточной терапии на морфологическую картину экспериментального ВЗК лабораторных животных.* В первые 48 ч у животных опытной группы отмечались клинические проявления патологического процесса: статистически значимая потеря

массы тела, сопровождаемая диареей, кровью в кале, загрязнением кожи вокруг анального отверстия и снижением двигательной активности [12].

На 4-е сутки после моделирования повреждения у животных опытной группы наблюдался илеоколит с поверхностными гнойными изъязвлениями до 1,5 см, покрытыми фибрином, гиперемия слизистой оболочки и утолщенных складок слизистой оболочки по типу «булыжная мостовая». Кроме того, у крыс опытной группы отмечался токсический мегаколон, о чем свидетельствует значительное увеличение отношения массы толстой кишки к ее длине (0,07 (0,06–0,12)) по сравнению с данным показателем в ГС (0,04 (0,04–0,05)), $p = 0,005$.

При патоморфологическом исследовании тонкой и толстой кишки у лабораторных крыс опытной группы выявлялись характерные признаки ВЗК. В тонкой кишке наблюдалась диффузно-очаговая атрофия ворсин, гиперплазия крипт, умеренная и выраженная инфильтрация межэпителиальными лимфоцитами, а также венозно-капиллярное полнокровие в слизистой оболочке. В слизистой оболочке толстой кишки выявлен тотальный фибриноидный некроз с полосовидными кровоизлияниями в подслизистой основе. Кроме того, наблюдалась густая трансмуральная инфильтрация и проникающая щелевидная язва (рис. 1).

После введения ММСК КМ лабораторным крысам с экспериментальным ВЗК воспалительная инфильтрация в тонкой кишке не выявлялась, клеточные и волокнистые элементы подслизистого и межмышечного нервных сплетений не имели патологических изменений. В толстой кишке наблюдалась слабая или умеренная межэпителиальная лимфоцитарная инфильтрация поверхностного эпителия и эпителия крипт, определялись очаговая гипертрофия подслизистого и мышечного слоев и небольшие локусы склероза в *lamina propria* (рис. 1). Кроме того, инфузия ММСК приводила к снижению отношения массы толстой кишки к ее длине до нормального значения (0,04 (0,04–0,05), $p = 0,50$).

Влияние культур ММСК на внутриклеточную продукцию ФНО- α макрофагами лабораторных крыс с экспериментальным ВЗК. Учитывая роль провоспалительных цитокинов в патогенезе ВЗК, проведена оценка влияния культур ММСК КМ на внутриклеточную продукцию ФНО- α макрофагами лабораторных крыс с экспериментальным ВЗК.

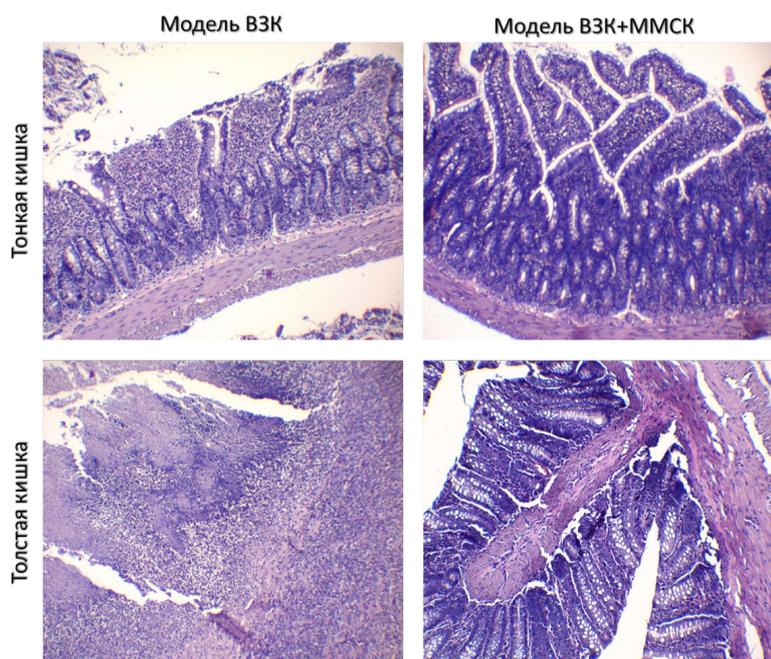


Рис. 1. Морфологическая характеристика тонкой и толстой кишки лабораторных крыс с экспериментальным ВЗК до и после введения ММСК

Fig. 1. Morphology of the small intestine and colon of laboratory rats with experimental IBD before and after MMSC administration

Количество CD68⁺-продуцирующих ФНО-α макрофагов в нестимулированных культурах лабораторных крыс с ВЗК составило 26,18 (25,41–26,86) %, что превышало аналогичный показатель в ГС (19,11 (17,83–19,90) %), $p = 0,021$.

Люминальные антигены играют важную роль в развитии ВЗК. Особый интерес представляет дрожжевой антиген маннан – компонент клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, участвующий в патогенетической индукции воспалительного процесса в кишечнике. Фосфо-пептидоманнаны дрожжей не являются типичными Т-клеточными антигенами, но в последнее время все больше доказательств того, что маннан *Saccharomyces cerevisiae* не только влияет на врожденный иммунный ответ, но и может взаимодействовать с Т-клетками [15].

На рис. 2 представлены результаты влияния ММСК на продукцию ФНО-α CD68⁺-клетками при стимуляции *in vitro* спленоцитов маннаном. Установлено, что у лабораторных животных с экспериментальным ВЗК количество ФНО-α-продуцирующих макрофагов отличалось от их количества в ГС и составило 25,52 (23,76–27,43) и 18,47 (18,05–19,37) % соответственно, $p = 0,0008$ (рис. 2).

Внутриартериальное введение ММСК не приводило к снижению экспрессии провоспалительного цитокина макрофагами животных с экспериментальным ВЗК (количество ФНО-α-позитивных клеток составило 28,92 (27,25–31,50) %, $p > 0,05$). В то же время у животных с ВЗК при внутривенном введении клеточных культур установлено снижение маннан-индуцированной продукции ФНО-α (22,70 (22,49–23,57) %, $p = 0,016$) при сохранении статистически значимых различий по сравнению с данным показателем у животных ГС (рис. 2).

Влияние культур ММСК на пролиферацию спленоцитов лабораторных крыс с экспериментальным ВЗК. На рис. 3 представлены оригинальные гистограммы, характеризующие количество пролиферирующих спленоцитов в нестимулированной культуре и при стимуляции ConA у крысы с экспериментальным ВЗК до и после клеточной терапии по сравнению с аналогичными показателями у крысы из ГС.

Статистическая обработка результатов стимулированной пролиферации спленоцитов исследуемых групп представлена в таблице.

Количество спонтанно пролиферирующих спленоцитов в исследуемых группах не отличалось ($p > 0,05$). При культивировании с ConA в равной степени усиливалась неспецифическая пролиферация спленоцитов как в ГС, так и в группе животных с ВЗК. Внутриартериальное и внутривенное введение ММСК супрессировали ConA-стимулированную пролиферацию спленоцитов по сравнению с таковой у животных с экспериментальной моделью без клеточной терапии ($p = 0,03$ и $p = 0,05$ соответственно).

При этом значимых различий в ConA-индуцированной пролиферации спленоцитов животных с ВЗК при внутриартериальном и внутривенном введении ММСК не выявлено, что под-

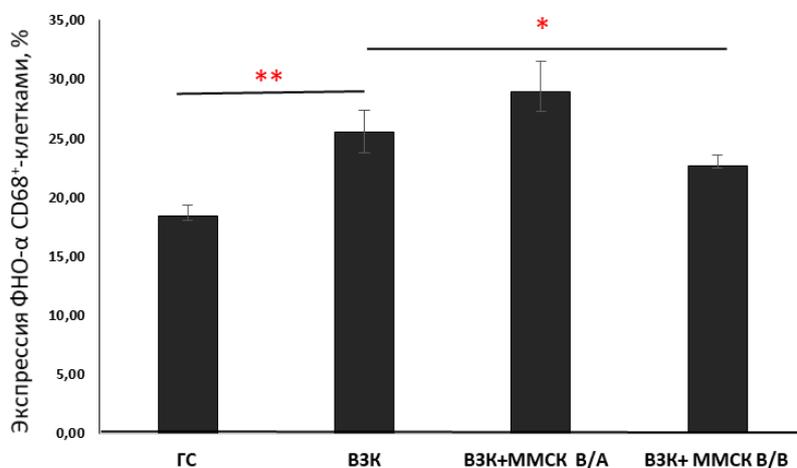


Рис. 2. Маннан-индуцированная продукция ФНО-α CD68⁺-макрофагами у животных исследуемых групп

Fig. 2. Mannan-induced production of TNF-α by CD68⁺-macrophages in the study groups

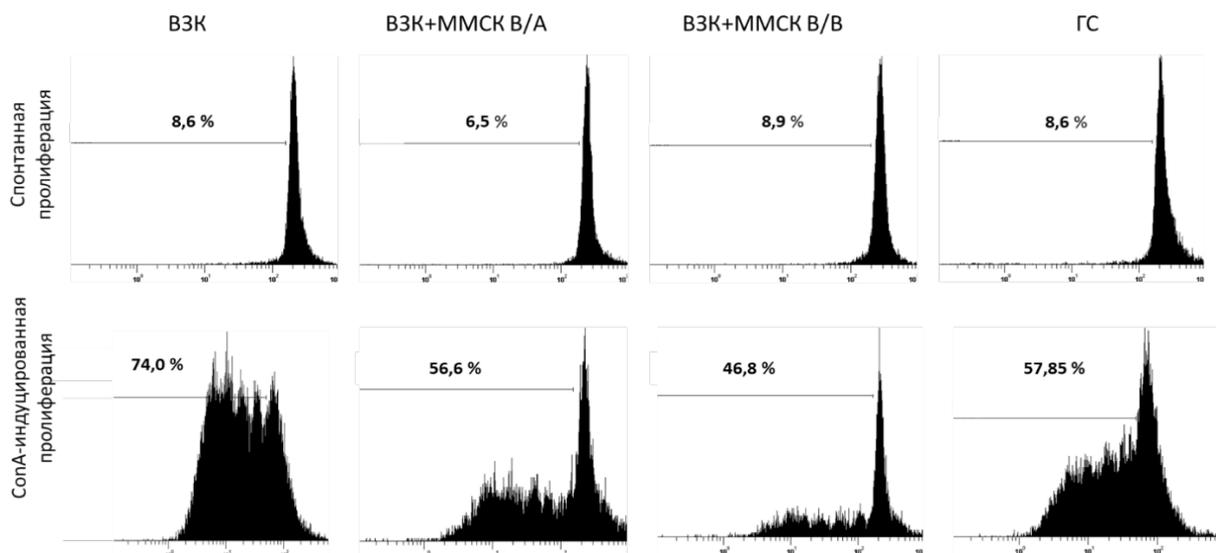


Рис. 3. Количество спонтанно пролиферирующих (верхняя панель) и ConA-стимулированных (нижняя панель) спленоцитов у животных исследуемых групп

Fig. 3. The number of spontaneously proliferating (top panel) and ConA-stimulated (bottom panel) splenocytes in the study groups

тверждено рассчитанными коэффициентами супрессии (κ), которые составили 31,2 (12,2–53,8) и 36,5 (30,9–37,8) % соответственно. Полученные значения κ обратно коррелировали с массой селезенки ($R = -0,59$; $p = 0,004$) и коэффициентом соотношения массы селезенки к массе тела животного ($R = -0,67$; $p = 0,01$).

Содержание пролиферирующих спленоцитов при различных условиях их культивирования у животных исследуемых групп, % (Me (Q = 0,25–0,75))

The level of proliferating splenocytes of study groups animals under different cultivation conditions, % (Me (Q = 0.25–0.75))

Условия культивирования	Исследуемая группа				<i>p</i>
	ГС	ВЗК	ВЗК + ММСК		
			в/а	в/в	
1	2	3	4		
Medium	10,75 (6,58–13,25)	10,85 (9,90–13,08)	8,85 (8,05–12,71)	11,80 (8,98–14,70)	<i>n/s</i>
ConA	57,85 (49,7–69,84)	67,05 (56,3–78,9)	50,15 (30,2–63,2)	50,63 (44,2–62,3)	$p_{2-3} = 0,03$ $p_{2-4} = 0,05$ $p_{3-4} = 0,56$
Mannan	9,90 (6,8–11,8)	10,85 (9,80–16,6)	7,90 (7,30–15,2)	11,80 (9,68–15,1)	$p_{1-2} = 0,08$ $p_{2-3} = 0,06$

При оценке специфической пролиферации спленоцитов выявлена тенденция к увеличению количества пролиферирующих маннан-индуцированных клеток у крыс с экспериментальным ВЗК (см. таблицу). Тенденция к снижению пролиферативной активности спленоцитов установлена только при внутриартериальном введении ММСК. Рассчитанные коэффициенты супрессии в маннан-стимулированных культурах при внутриартериальном и внутривенном введении ММСК составили 32,26 (28,57–33,18) и 14,29 (10,71–20,28) % соответственно, $p = 0,245$.

Заключение. Клеточная терапия ММСК оказывает иммуномодулирующее действие и приводит к снижению маннан-индуцированной продукции ФНО- α CD68⁺-клетками лабораторных животных с экспериментальным ВЗК при внутривенном введении клеточных культур. Внутриартериальная и внутривенная инфузия ММСК КМ вызывает супрессию митоген-стимулированной пролиферации спленоцитов на фоне улучшения патоморфологической картины и корреляции

иммунологических показателей с клиническими признаками повреждения. При этом различий в антипролиферативном действии ММСК в зависимости от способа введения не выявлено. Внутривенная клеточная терапия также способствует снижению маннан-индуцированной пролиферации спленоцитов *in vitro*, что подтверждает иммуносупрессивное действие культур ММСК на аутореактивные клоны спленоцитов при экспериментальном ВЗК.

Учитывая патогенетические механизмы развития воспаления в кишке, полученные результаты свидетельствуют о противовоспалительном эффекте клеточной терапии при экспериментальном моделировании ВЗК, что является обоснованием для комбинированного введения культур ММСК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Фенотипический профиль лимфоидных клеток периферической крови пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника / М. М. Зафранская [и др.] // Мед. иммунология. – 2020. – Т. 22, № 6. – С. 1131–1140.
2. Воспалительные заболевания кишечника: на перекрестке проблем / А. В. Ткачев [и др.] // Практ. медицина. – 2012. – Т. 3, № 58. – С. 17–22.
3. Danese, S. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases / S. Danese, C. Fiocchi // World J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 12, N 30. – P. 4807–4812. <https://doi.org/10.3748/wjg.12.4807>
4. The achievements and challenges of mesenchymal stem cell-based therapy in inflammatory bowel disease and its associated colorectal cancer / D. K. W. Ocansey [et al.] // Stem Cells Int. – 2020. – Vol. 2020, art. ID 7819824. <https://doi.org/10.1155/2020/7819824>
5. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies / B. Ahluwalia [et al.] // Scand. J. Gastroenterol. – 2018. – Vol. 53, N 4. – P. 379–389. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597>
6. Review article: mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases / C. Grégoire [et al.] // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2017. – Vol. 45, N 2. – P. 205–221. <https://doi.org/10.1111/apt.13864>
7. Systematic exposition of mesenchymal stem cell for inflammatory bowel disease and its associated colorectal cancer / J. Kang [et al.] // BioMed Res. Int. – 2018. – Vol. 2018, art. ID 9652817. <https://doi.org/10.1155/2018/9652817>
8. Kim, D. H. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies / D. H. Kim, J. H. Cheon // Immune Network. – 2017. – Vol. 17, N 4. – P. 25–40. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.25>
9. Guan, Q. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease / Q. A Guan // J. Immunol. Res. – 2019. – Vol. 2019, art. ID 7247238. <https://doi.org/10.1155/2019/7247238>
10. Mesenchymal stem cell-gut microbiota interaction in the repair of inflammatory bowel disease: an enhanced therapeutic effect / D. K. W. Ocansey [et al.] // Clin. Transl. Med. – 2019. – Vol. 8, N 31. – P. 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40169-019-0251-8>
11. Экспериментальное моделирование ВЗК *in vivo* / А. Ю. Адамович [и др.] // Колопроктология. – 2019. – Т. 18, № 3 (прил.). – С. 78.
12. Экспериментальное моделирование воспалительных заболеваний кишечника / А. Ю. Адамович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / РНПЦ ЭИМ. – Минск, 2019. – № 12. – С. 206–207.
13. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на пролиферацию Т-клеток памяти у пациентов с рассеянным склерозом / М. М. Зафранская [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2010. – № 3. – С. 24–31.
14. Влияние мононуклеаров костного мозга и мезенхимальных стволовых клеток на пролиферацию спленоцитов крыс *in vitro* / М. М. Зафранская [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2015. – № 4. – С. 30–37.
15. Association of deficiency for mannan-binding lectin with antimannan antibodies in Crohn's disease: a family study / F. Seibold [et al.] // Inflamm. Bowel Dis. – 2007. – Vol. 13, N 9. – P. 1077–1082. <https://doi.org/10.1002/ibd.20156>

References

1. Zafranskaya M. M., Adamovich A. Yu., Vorobei A. V., Starostin A. M., Nizhegorodova D. B. Phenotypic peripheral blood lymphoid cells profile in patients with inflammatory bowel diseases. *Meditinskaya immunologiya* [Medical immunology], 2020, vol. 22, no. 6, pp. 1131–1140 (in Russian).
2. Tkachev A. V., Mkrtchyan L. S., Nikitina K. E., Volynskaya E. I. Inflammatory bowel disease: crossing of the problems. *Prakticheskaya meditsina* [Practical medicine], 2012, vol. 3, no. 58, pp. 17–22 (in Russian).
3. Danese S., Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, vol. 12, no. 30, pp. 4807–4812. <https://doi.org/10.3748/wjg.12.4807>
4. Ocansey D. K. W., Qiu W., Wang J., Yan Y., Qian H., Zhang X., Xu W., Mao F. The achievements and challenges of mesenchymal stem cell-based therapy in inflammatory bowel disease and its associated colorectal cancer. *Stem Cells International*, 2020, vol. 2020, art. ID 7819824. <https://doi.org/10.1155/2020/7819824>
5. Ahluwalia B., Moraes L., Magnusson M. K., Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2018, vol. 53, no. 4, pp. 379–389. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597>
6. Grégoire C., Lechanteur C., Briquet A., Baudoux É., Baron F., Louis E., Beguin Y. Review article: mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2017, vol. 45, no. 2, pp. 205–221. <https://doi.org/10.1111/apt.13864>

7. Kang J., Zhang L., Luo X., Ma X., Wang G., Yang Y. [et al.]. Systematic exposition of mesenchymal stem cell for inflammatory bowel disease and its associated colorectal cancer. *BioMed Research International*, 2018, vol. 2018, art. ID 9652817. <https://doi.org/10.1155/2018/9652817>
8. Kim D. H., Cheon J. H. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune Network*, 2017, vol. 17, no. 1, pp. 25–40. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.25>
9. Guan Q. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology Research*, 2019, vol. 2019, art. ID 7247238. <https://doi.org/10.1155/2019/7247238>
10. Ocansey D. K. W., Wang L., Wang J., Yan Y., Qian H., Zhang X., Xu W., Mao F. Mesenchymal stem cell-gut microbiota interaction in the repair of inflammatory bowel disease: an enhanced therapeutic effect. *Clinical and Translational Medicine*, 2019, vol. 8, no. 31, pp. 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40169-019-0251-8>
11. Adamovich A. Yu., Dybov O. G., Starostin A. M., Vanslav M. I., Ignatovich T. V., Nizhegorodova D. B. Experimental modeling IBD *in vivo*. *Koloproktologiya [Koloproctology]*, 2019, vol. 18, no. 3 (suppl.), p. 78 (in Russian).
12. Adamovich A. Yu., Dybov O. G., Starostin A. M., Ignatovich T. V. Experimental model of inflammatory bowel disease. *Sovremennye problemy infeksionnoi patologii cheloveka: sbornik nauchnykh trudov* [Modern problems of infectious human pathology: collection of scientific papers]. Minsk, 2019, no. 12, pp. 206–207 (in Russian).
13. Zafranskaya M. M., Fedulov A. S., Nizhegorodova D. B., Motuzova Ya. M., Kolobova M. Yu., Bagatka S. S., Milanovich N. F., Ivanchik G. I. Influence of mesenchymal stem cells on the memory T-cells proliferation in patients with multiple sclerosis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2010, no. 3, pp. 24–31 (in Russian).
14. Zafranskaya M. M., Nizhegorodova D. B., Kondratovich T. V., Yurkevich M. Yu., Komissarov K. S., Ivanchik G. I., Kulinich S. S., Pilotovich V. S. Influence of bone marrow mononuclear cells and mesenchymal stem cells on the splenocyte proliferation of rats *in vitro*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2015, no. 4, pp. 30–37 (in Russian).
15. Seibold F., Boldt A. B. W., Seibold-Schmid B., Schoepfer A. M., Flogerzi B., Müller S., Kun J. F. J. Association of deficiency for mannan-binding lectin with antimannan antibodies in Crohn's disease: a family study. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2007, vol. 13, no. 9, pp. 1077–1082. <https://doi.org/10.1002/ibd.20156>

Информация об авторах

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

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

Шадрина Виктория Кирилловна – мл. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nika.shadrina@bk.ru

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

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

Владимирская Татьяна Эрнстовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, заведующий отделом. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

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, заведующий кафедрой. Международный экологический институт им. А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zafranskaya@gmail.com

Information about the authors

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

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

Viktoriya K. Shadrina – Junior Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nika.shadrina@bk.ru

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

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

Tat'yana E. Vladimirskaia – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Department. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus).

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: dept-surg@hotmail.com

Marina M. Zafranskaya – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zafranskaya@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.24-036.12:616.447-008.61

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-186-195>

Поступила в редакцию 04.11.2020

Received 04.11.2020

Н. В. Карлович¹, О. С. Спиридонова², Е. Г. Сазонова¹, Т. В. Мохорт²

¹*Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения,
Минск, Республика Беларусь*

²*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНТНОГО ИНТЕРВАЛА ПАРАТГОРМОНА У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ СТАДИЯМИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Аннотация. Вторичный гиперпаратиреоз (ВГПТ) является одним из наиболее клинически значимых осложнений хронической болезни почек (ХБП), обусловленных ассоциированными минеральными, костными нарушениями, метастатической кальцификацией.

Проанализированы показатели минерально-костного обмена у 635 пациентов с различными стадиями ХБП и у 50 лиц группы контроля при помощи нейросетевого алгоритма и математической технологии BootStrap, что позволило определить целевые интервалы паратгормона (ПТГ) для каждой стадии у пациентов с ХБП, соответствующие оптимальным показателям минеральной плотности и обмена костной ткани, с целью улучшения выживаемости данной категории пациентов. Установлено, что у пациентов с ХБП верхний предел референтного интервала уровня ПТГ при скорости клубочковой фильтрации (СКФ) более 35 мл/мин совпадает с общепопуляционным, при СКФ, равной 15–35 мл/мин, составляет 185 пг/мл (в 3 раза превышает общепопуляционный), а при СКФ менее 15 мл/мин – 500 пг/мл (в 7,5 раза превышает общепопуляционный). У диализных пациентов при уровне ПТГ 500–1500 пг/мл возможно сохранение удовлетворительных параметров костного обмена, а уровень ПТГ более 1500 пг/мл указывает на экстремальный риск развития осложнений ВГПТ.

Ключевые слова: паратгормон, вторичный гиперпаратиреоз, хроническая болезнь почек, скорость клубочковой фильтрации, минеральная плотность кости

Для цитирования: Определение референтного интервала паратгормона у пациентов с различными стадиями хронической болезни почек / Н. В. Карлович [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 186–195. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-186-195>

Natalia V. Karlovich¹, Olga S. Spiridonova², Elena G. Sazonova¹, Tatiana V. Mokhort²

¹*Republican Center of Medical Rehabilitation and Balneotherapy, Minsk, Republic of Belarus*

²*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

DETERMINATION OF THE PARATHYROID HORMONE REFERENCE INTERVAL IN PATIENTS WITH DIFFERENT STAGES OF THE CHRONIC KIDNEY DISEASE

Abstract. Secondary hyperparathyroidism (SHPT) is one of the most clinically significant complications of chronic kidney disease (CKD) due to associated mineral, bone disorders, and metastatic calcification. The indicators of mineral and bone metabolism of 635 patients with different CKD stages and 50 persons of the control group were analyzed using a neural network algorithm and the mathematical technology BootStrap, which allowed determining the target PTH intervals for each stage in patients with CKD, corresponding to the optimal indicators of mineral density and metabolism bone tissue, in order to improve the survival of this category of patients. It was found that the upper limit of the reference interval of the PTH level in patients with CKD and GFR > 35 ml/min coincides with the general population, in patients with CKD and GFR 15–35 ml/min it is 185 pg/ml, which is 3 times higher than in the general population, and in patients with CKD and GFR < 15 ml/min it is 500 pg/ml (7.5 times higher than in the general population). In dialysis patients with the PTH level of 500–1500 pg/ml, it is possible to maintain satisfactory parameters of bone metabolism, and the PTH level of >1500 pg/ml determines the extreme risk of developing severe SHPT complications.

Keywords: parathyroid hormone, secondary hyperparathyroidism, chronic kidney disease, glomerular filtration rate, bone mineral density

For citation: Karlovich N. V., Spiridonova O. S., Sazonova E. G., Mokhort T. V. Determination of the parathyroid hormone reference interval in patients with different stages of the chronic kidney disease. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 186–195 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-186-195>

Введение. Вторичный гиперпаратиреоз (ВГПТ) является одним из наиболее клинически значимых осложнений хронической болезни почек (ХБП) в связи с ассоциированными минеральными, костными нарушениями, метастатической кальцификацией. Гиперпродукция паратгормона (ПТГ) начинается уже на ранней стадии ХБП, что обусловлено рядом патогенетических факторов и в первую очередь нарушением гидроксилирования в почках витамина Д [1–5].

В настоящее время неясно, какой интервал уровня ПТГ следует считать нормальным при стадиях ХБП 3–5 [2, 6]. Очевидно, что при ХБП 1–2 границы нормы не будут отличаться от аналогичного показателя в общей популяции [7–9].

Впервые Клинические рекомендации по ведению больных с ХБП с нарушением костного метаболизма (K/DOQI – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) были разработаны в феврале 2003 г. группой экспертов под руководством профессора Shaul Massry (США). В данных рекомендациях для пациентов с ХБП 3 предлагается считать нормальным интервал уровня ПТГ 35–70 пг/мл, с ХБП 4 – 70–110; с ХБП 5 – 150–300 пг/мл [6]. В более поздних рекомендациях Kidney Disease: Improving Global Outcomes [10] предложено считать нормальным интервал уровня ПТГ от 2- до 9-кратного превышения верхней границы референсного диапазона. Интервал для ХБП 3 и ХБ 4 данными рекомендациями не определен.

Цель исследования – определить референтные интервалы паратгормона у пациентов с различными стадиями хронической болезни почек.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 635 пациентов с различными стадиями ХБП и 50 лиц группы контроля. Средний возраст обследованных составил $49,3 \pm 13,8$ (20,0–80,0) года, ИМТ – $25,8 \pm 5,3$ (14,7–53,3) кг/м².

У пациентов оценивали в сыворотке крови уровни ПТГ, витамина Д (25(ОН)D3), кальция общего (Ca), фосфора (P), уровни маркеров костного метаболизма: щелочной фосфатазы, остеокальцина (OC), C-концевых телопептидов коллагена I типа (СТх). Биохимический и гормональный анализ крови выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas e6000 с использованием коммерческих наборов фирмы Roche Diagnostics GmbH.

Минеральную плотность кости (МПК) определяли методом двойной рентгеновской абсорбциометрии на денситометре ProdigyLunar (GeneralElectric, США). МПК оценивали на основании ее абсолютных значений (в г/см²), T -критерия ($T_{кр}$) и Z -критерия ($Z_{кр}$) в трех регионах скелета: поясничном отделе позвоночника, на уровнях L1–L4, в проксимальном отделе бедра, в областях upperneck, neck, totalhip, в дистальной трети лучевой кости не доминантной руки, в области radius 33 %. Денситометр оснащен компьютерной программой, позволяющей на основании абсолютного значения МПК автоматически рассчитать показатели Z и T . Согласно рекомендациям Общества клинической денситометрии [11], значение показателей $T_{кр}$ и $Z_{кр}$ менее $-1,0$ указывает на низкую костную массу, менее $-2,5$ – на остеопороз.

Анализ данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10,0 (Stat Soft, 2001) и Anaconda (Python), изучение статистических параметров распределения признаков – с использованием методов описательной статистики. Для сравнения групп между собой применяли соответствующие параметрические и непараметрические тесты. Проверку соответствия реального распределения переменных нормальному осуществляли с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Критический уровень значимости при оценке параметров распределения принимали равным 0,05.

Первоначальная задача при анализе данных заключалась в том, чтобы разбить (кластеризовать) пациентов на группы в зависимости от состояния костного обмена и выделить группу с наиболее оптимальными показателями. Для кластеризации пациентов по группам применяли нейросетевой алгоритм (автоэнкодер), состоящий из энкодера и декодера. Энкодер состоял из двух слоев: 100 нейронов в первом слое и 50 нейронов во втором. Декодер имел соответствующую структуру, но слои располагались в обратном порядке. Скрытый слой состоял из 3 нейронов. Данное ограничение на количество нейронов в скрытом слое позволяло модели отбирать наиболее значимые параметры (комбинации параметров). Далее на модель подавали обучающие данные. Сигнал снимался со скрытого слоя и обрабатывался с помощью методов кластеризации без учителя (метод k -средних, DBSCAN). Далее в сформированных группах и подгруппах был проведен анализ выживаемости пациентов методом Каплана–Мейера.

Результаты исследования. По результатам точечных оценок средних значений уровней ПТГ, P, Ca, Ca⁺⁺, магния (Mg) установлено, что при усугублении почечной недостаточности отмечаются рост уровней ПТГ, P, Mg и снижение уровня Ca. Попарные сравнения групп не выявили достоверных различий между пациентами с ХБП 1–2 и ХБП 3. При сравнении групп пациентов с ХБП 3 и ХБП 4 установлены достоверные различия между такими показателями, как возраст пациентов ($z = 2,04$; $p = 0,042$), уровни ПТГ ($z = 5,20$; $p < 0,000001$), 25(OH)D3 ($z = -3,26$; $p = 0,001$), P ($z = 2,54$; $p = 0,011$). Между группами пациентов с ХБП 4 и ХБП 5 установлены достоверные различия уровней ПТГ ($z = 3,55$; $p = 0,0004$), P ($z = 3,12$; $p = 0,002$), Ca ($z = -3,22$; $p = 0,001$).

У лиц контрольной группы и у пациентов с ХБП 1–2 95 %-ный ДИ ПТГ не имел различий и составлял 38–50 пг/мл. Начиная с ХБП 3 происходил постепенный рост средних значений ПТГ, который достигал максимума у диализных пациентов. Зарегистрированы статистически значимые различия между группами 2 и 3 ($z = -7,59$; $p < 0,000001$), 3 и 4 ($z = -5,34$; $p < 0,000001$). Точечные оценки средних имели тенденцию к различиям между группами 4 и 5, однако эти различия были статистически не значимы ($z = -0,16$; $p = 0,877$). Эти группы включали пациентов с терминальной стадией ХБП, при этом в группе 4 были додиализные пациенты, а в группе 5 – получавшие постоянную заместительную почечную терапию.

Для уточнения уровня СКФ, при котором происходит рост ПТГ выше верхнего значения референтного интервала в общей популяции (65 пг/мл), проведен ROC-анализ (рис. 1).

Установлено, что уровень ПТГ выше верхней границы референтного интервала нормы при уровне рСКФ ниже 35,8 мл/мин (диагностическая чувствительность – 90,4 %, специфичность – 71,4 %).

Уровень ПТГ в пределах референтного интервала (15–65 пг/мл) зарегистрирован у пациентов контрольной группы – 92,9 %, у лиц с ХБП 1–2 – 84,7 (различия статистически не значимы), с ХБП 3 – 61,3, с ХБП 4 – 10,9 %, с ХБП 5 (у додиализных пациентов – 3,5 %, у диализных – 16,9, в группе контроля – 41,9 %).

При разделении группы пациентов с ХБП на две подгруппы – с СКФ ≤ 35 мл/мин и с СКФ > 35 мл/мин – установлено, что распространенность ВГПТ составляет 85 и 26 % соответственно ($p < 0,0001$).

Для определения оптимального интервала ПТГ и состояния костного обмена у пациентов с различными стадиями ХБП была проведена кластеризация пациентов по группам с помощью нейросетевого алгоритма (автоэнкодера, состоящего из энкодера и декодера), алгоритма DBSCAN и метода к-средних. Были получены 4 группы (кластера) (рис. 2): кластер 0 – красные точки, кластер 1 – зеленые точки, кластер 2 – синие точки, кластер 3 – желтые точки.

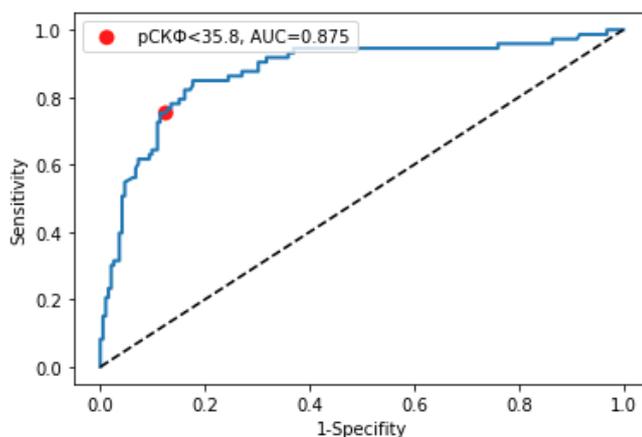


Рис. 1. ROC-кривая для определения точки отсечения уровня СКФ, при котором происходит рост уровня ПТГ выше верхней границы референтного интервала для здоровой популяции

Fig. 1. ROC-curve for determining the cut-off point for the GFR level, at which the PTH level rises above the upper limit of the reference interval for the healthy population

Как видно из рис. 2, показатели МПК ($T_{кр}$ и $Z_{кр}$) значительно отличались в полученных кластерах: в кластере 0 они имели минимальные значения и находились в интервале, соответствующем остеопении или остеопорозу; в кластере 1 – преимущественно в интервале остеопении; в кластере 2 были в районе нулевого значения; в кластере 3 превышали нулевую отметку.

Далее был проведен сравнительный анализ распределения уровней ПТГ, витамина Д и маркеров костного и минерального обмена в данных кластерах.

В кластере 0 отмечены наиболее высокие средние уровни и наиболее выраженный разброс значений ПТГ, ОС, СТх, Р. При этом уровень витамина Д был наиболее низким. В кластере 3, напротив, отмечены наиболее низкие значения указанных показателей и наименее выраженный разброс их значений. Уровень витамина Д был наиболее высоким. Кластеры 1 и 2 практически не отличались по средним значениям показателей и разбросу их значений.

В каждом кластере проведена оценка распределения уровней ПТГ в подгруппах пациентов с различными стадиями ХБП (рис. 3). Установлены достоверные различия уровней ПТГ внутри каждого кластера в зависимости от уровня СКФ в группах. При этом степень изменений варьировалась в зависимости от кластера. В кластере 3 отмечены наименьшие различия в уровне ПТГ у пациентов с различными стадиями ХБП, максимальные различия зарегистрированы в кластере 0.

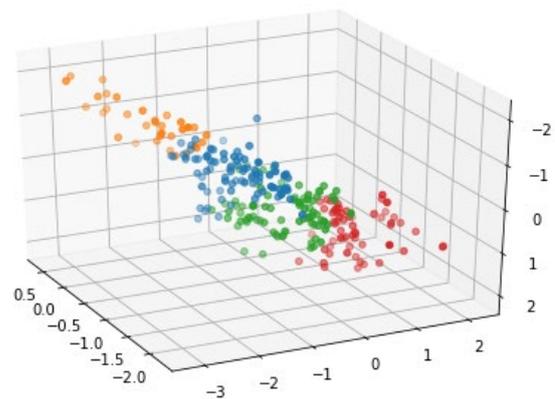


Рис. 2. Кластеризация пациентов с помощью автоэнкодера и алгоритма DBSCAN (3-мерный график, сигнал с трех нейронов)

Fig. 2. Patient clustering using the autoencoder and the DBSCAN algorithm (3D signal from 3 neurons)

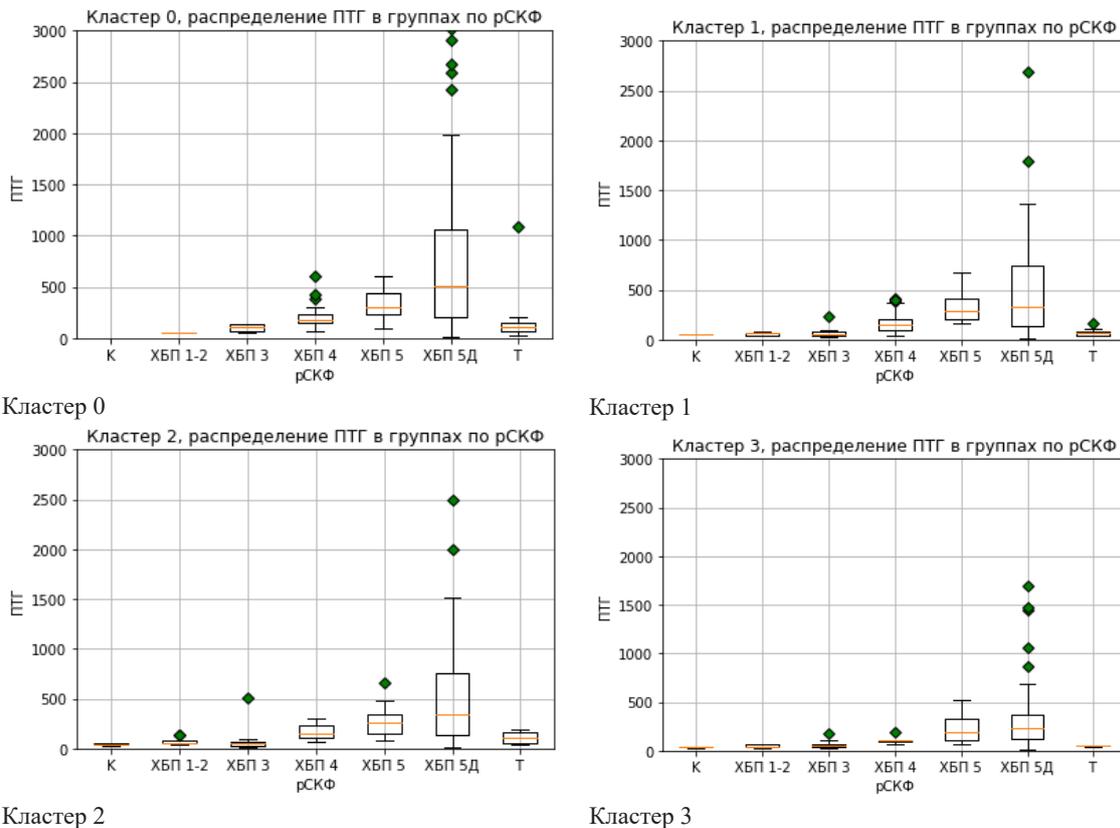


Рис. 3. Распределение уровня ПТГ в зависимости от кластера и стадии ХБП

Fig. 3. Distribution of PTH levels depending on the cluster and the CKD stage

Не установлено представителей кластеров 0 и 1 у лиц контрольной группы. Среди пациентов с ХБП и сохранной функцией почек не было лиц из кластера 0.

Проанализирована выживаемость диализных пациентов в зависимости от кластера. Самый быстрый спад совокупной доли выживших наблюдался в кластере 0. В кластерах 1–3 на начальных этапах наблюдения данный показатель был примерно на одном уровне. Далее в кластере 1 наблюдался резкий спад совокупной доли выживших до относительно низкого значения – 0,22, что ниже, чем в остальных кластерах. В кластере 3 показатель выживаемости снижался немного быстрее, чем в кластере 2. Однако конечная совокупная доля выживших пациентов в подгруппе 3 была самая высокая – 0,31. Таким образом, наилучшая выживаемость была зарегистрирована у пациентов в кластере 3.

В соответствии с результатами кластеризации и анализа выживаемости установлено, что оптимальное состояние костного метаболизма соответствует показателям кластера 3. Значения уровня ПТГ в данном кластере может быть принято за референтный интервал в каждой конкретной подгруппе с учетом уровня рСКФ и стадии ХБП. В табл. 1 представлены точечные оценки квантилей уровня ПТГ в группах пациентов с различными стадиями ХБП и в контрольной группе.

Таблица 1. Квантили уровня ПТГ у пациентов с различными стадиями ХБП и в контрольной группе
Table 1. PTH level quantiles in patients with different CKD stages and in the control group

Группа	Квантили (Q), пг/мл						
	Q_50	Q_25	Q_75	Q_10	Q_90	Q_2,5	Q_97,5
1 (ХБП 1–2)	40,9	33,5	60,6	25,1	61,9	22,2	62,4
2 (ХБП 3)	50,6	32,3	67,0	31,4	121,5	31,1	162,4
3 (ХБП 4)	107,7	87,4	112,0	67,5	144,0	61,1	179,2
4 (ХБП 5)	186,0	102,3	323,3	79,7	442,5	68,4	502,1
5 (ХБП 5Д)	231,9	120,4	364,6	35,3	961,6	22,2	1496,8
6 (Т)	49,5	46,5	52,6	44,6	54,4	43,7	55,4
7 (контрольная)	35,4	31,4	36,1	29,0	36,5	27,8	36,7

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии значимых различий между квантилями Q_2,5, Q_10 уровня ПТГ в группах. Данные квантили в целом находятся в пределах референтного интервала для общей популяции. Это свидетельствует о возможности применения общепопуляционного показателя нижней границы референтного уровня ПТГ у пациентов с ХБП вне зависимости от СКФ.

При этом квантили Q_90, Q_97,5 находятся в пределах общепопуляционного референтного интервала у лиц контрольной группы, у пациентов с ХБП 1–2, в 2–2,5 раза превышают верхний предел референтного интервала у лиц с ХБП 3, ХБП 4 и возрастают до 500–1500 пг/мл у пациентов с ХБП 5, 5Д.

Для уточнения данных о доверительных интервалах квантилей уровня ПТГ Q_90, Q_97,5 была применена математическая технология BootStrap (табл. 2).

Согласно полученным данным, у пациентов с ХБП 1–2 и после трансплантации почки верхняя граница референтного интервала может быть принята на уровне 65,0 пг/мл. Результаты свидетельствуют, что в подгруппе пациентов с ХБП 3 при уровне СКФ более 35 мл/мин за верхний предел референтного интервала также может быть принято значение 65 пг/мл. Дальнейший анализ был проведен в четырех подгруппах пациентов: 1) СКФ > 35 мл/мин; 2) СКФ = 15–35 мл/мин; 3) СКФ < 15 мл/мин; 4) диализные пациенты.

Гистограммы распределения ПТГ в подгруппах пациентов в зависимости от уровня ПТГ и кластера представлены на рис. 4–7.

Как видно из рис. 4–7, во всех кластерах уровни ПТГ имели логнормальное распределение, при переходе к логарифмам распределение трансформировалось в нормальное.

Таблица 2. Доверительные интервалы квантилей уровня ПТГ у пациентов с различными стадиями ХБП и в контрольной группе (Q₉₀, Q_{97,5})

Table 2. Confidence intervals for the PTH level quantiles in the groups of patients with different CKD stages and in the control group (Q₉₀, Q_{97,5})

Группа	Доверительные интервалы квантилей (Q), пг/мл	
	BootStrap Q ₉₀	BootStrap Q _{97,5}
1 (ХБП 1–2)	62,2–67,8	61,2–75,6
2 (ХБП 3)	67,0–182,8	148,8–259,8
3 (ХБП 4)	97,2–181,9	167,5–248,7
4 (ХБП 5)	363,1–770,2	482,3–889,4
5 (ХБП 5Д)	454,2–1539,9	1302,0–2179,0
6 (Т)	53,2–65,5	55,1–67,3
7 (контрольная)	36,2–45,6	36,7–46,1

«Тело» распределения находилось в одинаковом диапазоне, а правые «хвосты» в разных кластерах существенно различались. В кластере 0 «хвост» оканчивался на уровне 3000, в кластерах 1 и 2 – на уровне 2500, в кластере 3 – на уровне 1500.

Так как «тело» для всех кластеров находится в одном диапазоне, можно сделать вывод, что при значениях ПТГ, не превышающих верхний предел референтного интервала, у пациентов также могут наблюдаться неудовлетворительные показатели МПК.

Если же ПТГ превышает данный порог, то у пациента с высокой долей вероятности будут наблюдаться неудовлетворительные показатели МПК. Это подтверждается наличием самого длинного «хвоста» распределения в кластере 0 и самого короткого в кластере 3.

Квантили уровней ПТГ в подгруппах пациентов с ХБП представлены в табл. 3. Для определения верхнего предела референтного интервала в подгруппах пациентов с ХБП было выбрано значение 97,5 квантиля в кластере 3.

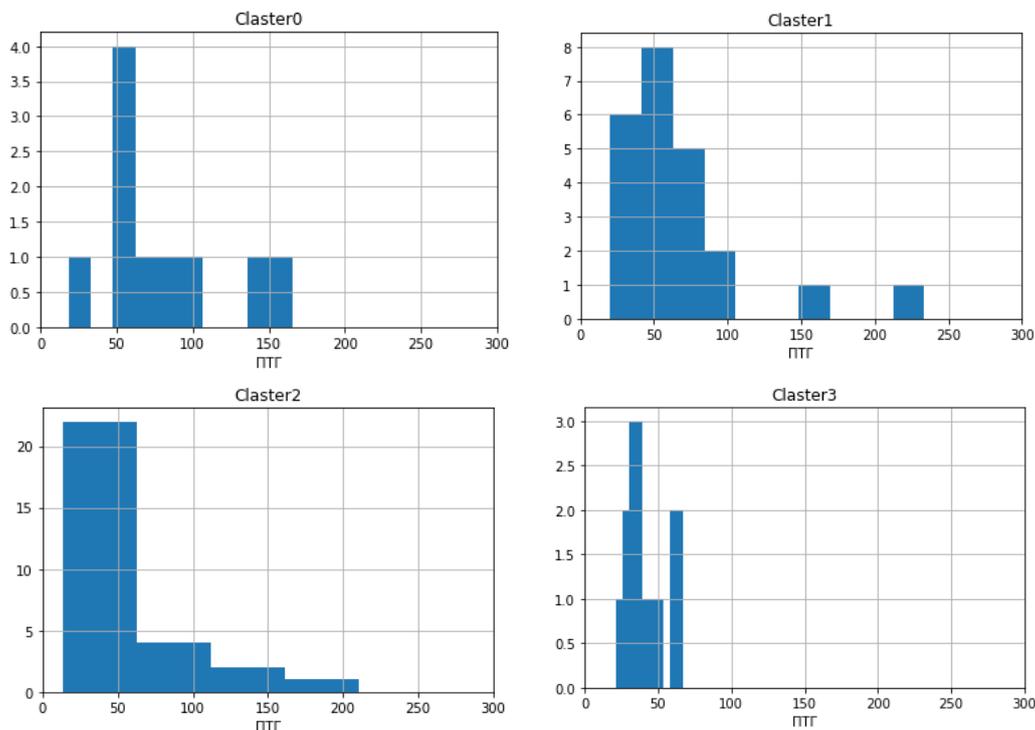


Рис. 4. Гистограммы распределения ПТГ в подгруппе 1

Fig. 4. Histograms of the PTH distribution in subgroup 1

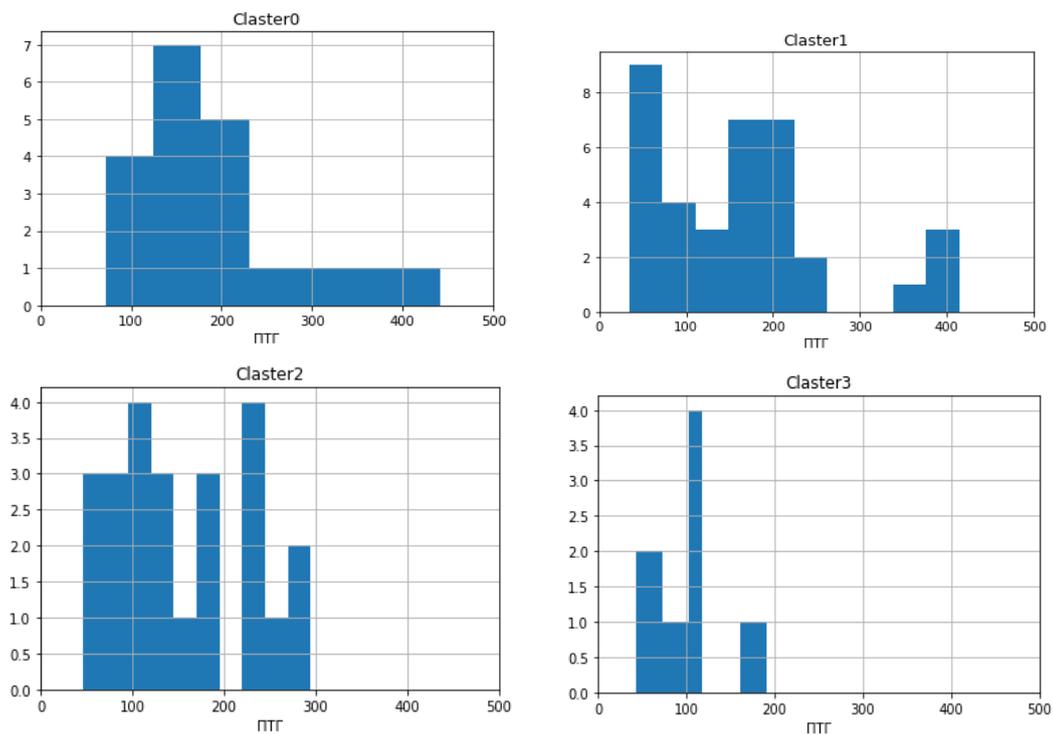


Рис. 5. Гистограммы распределения ПТГ в подгруппе 2
 Fig. 5. Histograms of the PTH distribution in subgroup 2

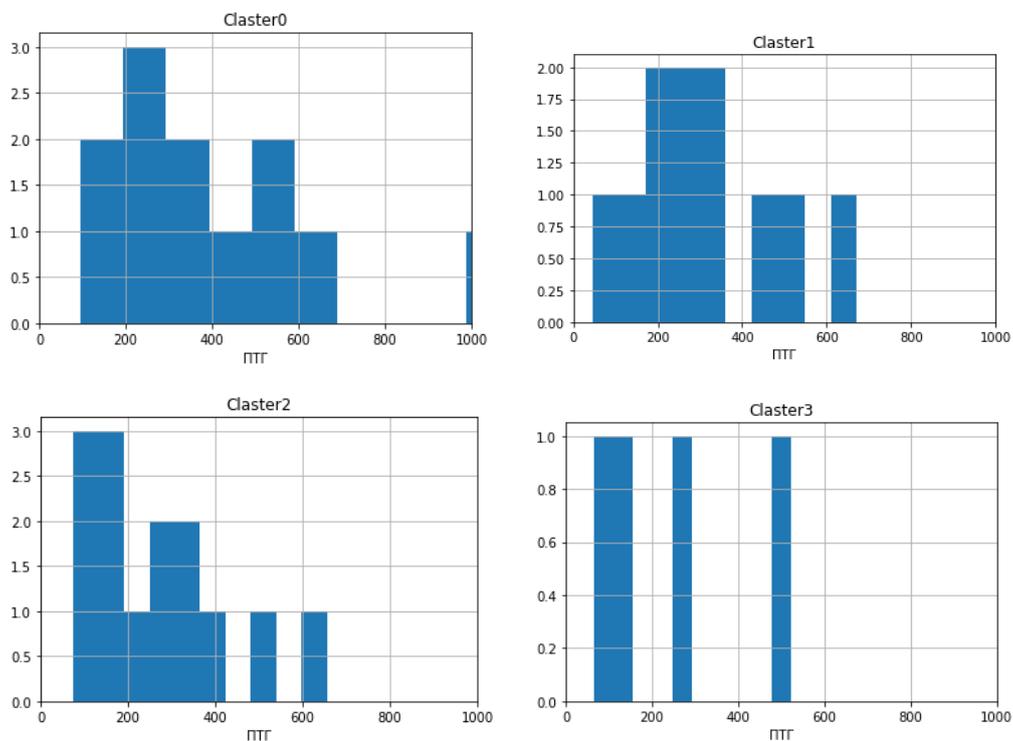


Рис. 6. Гистограммы распределения ПТГ в подгруппе 3
 Fig. 6. Histograms of the PTH distribution in subgroup 3

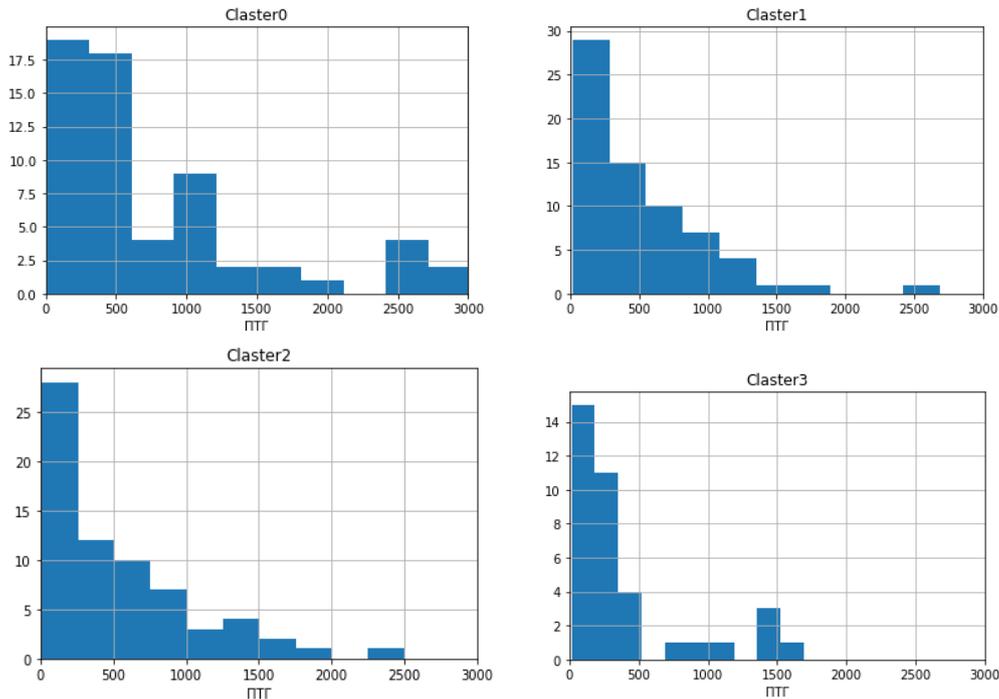


Рис. 7. Гистограммы распределения ПТГ в подгруппе 4

Fig. 7. Histograms of the PTH distribution in subgroup 4

Таблица 3. Квантили уровня ПТГ в подгруппах пациентов с ХБП

Table 3. PTH level quantiles in the subgroups of CKD patients

Под-группа	Квантили (Q), пг/мл							Доверительные интервалы квантилей BootStrap, пг/мл	
	Q_50	Q_25	Q_75	Q_10	Q_90	Q_2,5	Q_97,5	Q_90	Q_97,5
1	38,1	31,4	52,9	27,5	62,0	23,5	65,4	56–74	63–74
2	104,7	63,5	111,5	56,0	169,7	46,8	186,8	148–241	182–262
3	186,0	102,3	323,3	79,7	442,5	68,4	502,1	360–770	480–889
4	235,7	123,8	383,3	36,1	1184,8	22,4	1491,2	480–1539	1418–2100

Обсуждение. Целевые интервалы ПТГ и критерии диагностики ВГПТ и ассоциированных минеральных и костных нарушений являются предметом обсуждения эндокринологического и нефрологического мирового сообщества. Наиболее общепринятой рекомендацией в отношении целевого интервала ПТГ для диализных пациентов является значение ПТГ, в 2–9 раз превышающее верхний предел общепопуляционного референтного интервала, или 130–585 пг/мл [12]. Данные сведения получены на основе исследований различных контрольных точек развития осложнений ВГПТ и клинических исходов заболевания. Для додиализных стадий ХБП четкая концепция в настоящее время не разработана.

Получены данные, что ПТГ возрастает выше верхней границы референтного интервала нормы при СКФ < 35,8 мл/мин (диагностическая чувствительность – 90,4 %, специфичность – 71,4 %).

В нашем исследовании для определения референтного интервала ПТГ у пациентов с ХБП впервые был применен нейросетевой алгоритм, метод кластеризации без учителя. Методика применялась не к исходным данным, а к данным, свернутым автоэнкодером, что позволило кластеризовать пациентов по наиболее ключевым комбинациям признаков. Данные комбинации признаков стали разделимы не только линейно, но и по плотности, что обеспечило успешное применение методов DBSCAN, k-средних. Для подтверждения полученных в результате кластеризации данных проведен анализ выживаемости пациентов в каждом кластере.

Установлено, что нижний предел референтного интервала ПТГ не имеет значимых различий как в кластерах, так и в группах пациентов с различными стадиями ХБП. Важное значение

имеет верхний предел референтного интервала ПТГ, который у пациентов с СКФ < 35 мл/мин отличается от общепопуляционного.

За оптимальные интервалы уровня ПТГ приняты уровни от 10-го до 90-го квантиля. Поскольку в результате кластеризации количество наблюдений в группах уменьшилось, для получения доверительного интервала для квантилей был применен метод BootStrap. Суть метода состоит в том, чтобы по имеющейся выборке построить эмпирическое распределение. Используя это распределение как теоретическое распределение вероятностей, с помощью датчика псевдослучайных чисел сгенерировано большое число «фантомных» выборок, называемых BootStrap-выборками. Количество выбранных генерированных «фантомных» выборок составило 1000, тип определяемого доверительного интервала – Basic CI (эмпирический). Метод позволяет более точно оценить статистические характеристики и изучить их вероятностные распределения, оценить дисперсию или квантили статистики.

С учетом полученных данных установлен верхний предел референтного диапазона уровня ПТГ для пациентов с ХБП:

СКФ > 35 мл/мин (совпадает с общепопуляционным);

СКФ = 15–35 мл/мин (185 пг/мл, что в 3 раза превышает общепопуляционный);

СКФ < 15 мл/мин (500 пг/мл, что в 7,5 раза превышает общепопуляционный).

В группе 4 (диализные пациенты) «тело» распределения уровня ПТГ находилось в пределах 500 пг/мл. В ходе статистической обработки и анализа данных в этой группе значения ПТГ выше 730 пг/мл были идентифицированы как выбросы. Отмечено, что у 4 пациентов уровень ПТГ был выше 1000 пг/мл. Была произведена ручная подборка верхнего предела референтного диапазона уровня ПТГ. Рассматривались пороги 500, 730, 1000, 1500. В результате было установлено, что верхний предел референтного диапазона уровня ПТГ – 500 пг/мл, при ПТГ = 500–1500 пг/мл – высокий риск тяжелого ВГПТ, при ПТГ > 1500 пг/мл – экстремальный риск развития осложнений ВГПТ.

Выводы

1. Верхний предел референтного интервала уровня ПТГ у пациентов с ХБП (СКФ > 35 мл/мин) совпадает с общепопуляционным.

2. Для пациентов с ХБП и СКФ 15–35 мл/мин верхний предел референтного интервала уровня ПТГ составляет 185 пг/мл (в 3 раза превышает общепопуляционный), а для пациентов с ХБП и СКФ < 15 мл/мин – 500 пг/мл (в 7,5 раза превышает общепопуляционный).

3. У диализных пациентов уровень ПТГ более 1500 пг/мл определяет экстремальный риск развития осложнений ВГПТ. При уровне ПТГ 500–1500 пг/мл возможно сохранение удовлетворительных параметров костного обмена. В данном интервале для принятия адекватного решения по стратегии лечения необходим анализ дополнительных параметров.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Horl, W. H. The clinical consequences of secondary hyperparathyroidism: focus on clinical outcomes / W. H. Horl // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2004. – Vol. 19, suppl. 5. – P. v2–v8. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh1049>
2. Chronic kidney disease – mineral-bone disorder: a new paradigm / S. M. Moe [et al.] // *Adv. Chron. Kidney Dis.* – 2007. – Vol. 14, N 1. – P. 3–12. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2006.10.005>
3. Chronic kidney disease--mineral and bone disorder: a complex scenario / N. Mejía [et al.] // *Nefrologia.* – 2011. – Vol. 31, N 5. – P. 514–519. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2011.Jun.10926>
4. Miller, P. D. Fragility fractures in chronic kidney disease: an opinion-based approach / P. D. Miller // *Cleve Clin. J. Med.* – 2009. – Vol. 76, N 12. – P. 715–723. <https://doi.org/10.3949/ccjm.76a.08108>
5. Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS) / F. Tentori [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2008. – Vol. 52, N 3. – P. 519–530. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.03.020>
6. National Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) guidelines [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.kidney.org/professionals/guidelines>. – Date of access: 28.03.2021.
7. Diagnosis of Endocrine Disease: Evaluation of bone fragility in endocrine disorders / C. Eller-Vainicher [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2019. – Vol. 180, N 6. – P. R213–R232. <https://doi.org/10.1530/eje-18-0991>

8. Lee, J. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis / J. Lee, S. Vasikaran // *Ann. Lab. Med.* – 2012. – Vol. 32, N 2. – P. 105–112. <https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.2.105>
9. Serum levels of C-terminal telopeptide of type I collagen: a useful new marker of cortical bone loss in hemodialysis patients / S. Okuno [et al.] // *Osteoporos. Int.* – 2005. – Vol. 16, N 5. – P. 501–509. <https://doi.org/10.1007/s00198-004-1712-4>
10. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group: KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) // *Kidney Int. Suppl.* – 2017. – Vol. 7, N 3. – P. e1. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2017.10.001>
11. ISCD Official Positions 2019 Indications for bone mineral density testing [Electronic resource]. – Mode of access: <https://iscd.org/learn/official-positions/adult-positions/>. – Date of access: 28.03.2021.
12. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) / G. Eknoyan, N. Lameire, B. L. Kasiske [et al.] // *Kidney Int. Suppl.* – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 1–59. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2017.04.001>

References

1. Horl W. H. The clinical consequences of secondary hyperparathyroidism: focus on clinical outcomes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2004, vol. 19, suppl. 5, pp. v2–v8. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh1049>
2. Moe S. M., Drüeke T., Lameire N., Eknoyan G. Chronic kidney disease – mineral-bone disorder: a new paradigm. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2007, vol. 14, no. 1, pp. 3–12. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2006.10.005>
3. Mejía N., Roman-García P., Miar A. B., Tavira B., Cannata-Andía J. B. Chronic kidney disease – mineral and bone disorder: a complex scenario. *Nefrología*, 2011, vol. 31, no. 5, pp. 514–519. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2011.Jun.10926>
4. Miller P. D. Fragility fractures in chronic kidney disease: an opinion-based approach. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2009, vol. 76, no. 12, pp. 715–723. <https://doi.org/10.3949/ccjm.76a.08108>
5. Tentori F., Blayney M. J., Albert J. M., Gillespie B. W., Kerr P. G., Bommer J. [et al.]. Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *American Journal of Kidney Diseases*, 2008, vol. 52, no. 3, pp. 519–530. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.03.020>
6. *National Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) guidelines*. Available at: <https://www.kidney.org/professionals/guidelines> (accessed 28.03.2021).
7. Eller-Vainicher C., Falchetti A., Gennari L., Cairoli E., Bertoldo F., Vescini F., Scillitani A., Chiodini I. Diagnosis of endocrine disease: evaluation of bone fragility in endocrine disorders. *European Journal of Endocrinology*, 2019, vol. 180, no. 6, pp. R213–R232. <https://doi.org/10.1530/eje-18-0991>
8. Lee J., Vasikaran S. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Annals of Laboratory Medicine*, 2012, vol. 32, no. 2, pp. 105–112. <https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.2.105>
9. Okuno S., Inaba M., Kitatani K., Ishimura E., Yamakawa T., Nishizawa Y. Serum levels of C-terminal telopeptide of type I collagen: a useful new marker of cortical bone loss in hemodialysis patients. *Osteoporosis International*, 2005, vol. 16, no. 5, pp. 501–509. <https://doi.org/10.1007/s00198-004-1712-4>
10. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group: KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney International Supplements*, 2017, vol. 7, p. e1. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2017.10.001>
11. *ISCD Official Positions 2019 Indications for bone mineral density testing*. Available at: <https://iscd.org/learn/official-positions/adult-positions/> (accessed 28.03.2021).
12. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) / G. Eknoyan, N. Lameire, B. L. Kasiske, et al. *Kidney International Supplements*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 1–59. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2017.04.001>

Информация об авторах

Карлович Наталья Викторовна – канд. мед. наук, главный врач. Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения (ул. Макаенка, 17, 220017, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natkarlovich@gmail.com

Спиридонова Ольга Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: spiry87@mail.ru

Сазонова Елена Геннадьевна – врач-эндокринолог. Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения (ул. Макаенка, 17, 220017, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: trofi_elena@mail.ru

Мохорт Татьяна Вячеславовна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatsianamokhort@gmail.com

Information about the authors

Natalia V. Karlovich – Ph. D. (Med.), Chief Doctor. Republican Center of Medical Rehabilitation and Balneotherapy (17, Makayenka Str., 220017, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natkarlovich@gmail.com

Olga S. Spiridonova – Junior Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: spiry87@mail.ru

Elena G. Sazonova – Endocrinologist. Republican Center of Medical Rehabilitation and Balneotherapy (17, Makayenka Str., 220017, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: trofi_elena@mail.ru

Tatiana V. Mokhort – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatsianamokhort@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

UDC 616.314.17-008.1-07

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-196-203>

Received 25.01.2021

Sergey P. Rubnikovich¹, Liudmila N. Dedova¹, Pavel A. Semizhon²,
Yuliya L. Denisova¹, Olga V. Kandrukevich¹

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

SPECIFIC CHARACTERISTICS OF RAPID DIAGNOSIS IN PERIODONTOLOGY

Abstract. Currently, the advanced studies have been justified and implemented in the Republic of Belarus that enable the production and a practical use of a domestic rapid test and allow dentists to apply microbiological diagnosis methods.

The objective of the study was to develop a domestic rapid test for periodontology, indicating the procedure for preparatory clinical and laboratory measures using PCR and trypsin-like activity of periopathogenic microflora (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*)

Dental examination was performed in 60 patients with clinical signs of generalized periodontitis and a 5–6 mm deep pathological dentogingival pocket (PDGP), aged 35–44 (the main group), and 140 patients without signs of periodontal diseases, aged 20–24 (the control group). These patients were selected among the visitors of Chair No. 3 of the Belarusian State Medical University. The laboratory diagnosis was made using PCR and evaluating the trypsin-like activity of periopathogenic microflora.

The algorithm of preparatory clinical and laboratory measures was suggested for diagnosis of periodontal diseases, including material sampling and identification of periopathogenic microorganisms in the sample using a biochemical method; sampling, preservation and storage of material for quantitative PRC testing; and the identification of the genetic material of periopathogenic microorganisms by means of a real-time quantitative PRC method.

The basic principles of microbiological diagnosis in periodontology enable making a true diagnosis, planning treatment and assessing the treatment results.

We examined the content of the gingival sulcus and/or the periodontal pocket in patients who have periodontal diseases. It was noted that the most rational tools for removing the periodontal pocket content in patients with periodontal diseases was a paper pin.

The development of a domestic express test in periodontology demonstrated the need of preparatory clinical and laboratory activities using PCR and trypsin-like activity of periopathogenic microflora (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*).

Keywords: rapid diagnosis, periodontology, clinical and laboratory measures, periodontal tissue

For citation: Rubnikovich S. P., Dedova L. N., Semizhon P. A., Denisova Yu. L., Kandrukevich O. V. Specific characteristics of rapid diagnosis in periodontology. *Vesti Natsyunal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 196–203. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-196-203>

С. П. Рубникович¹, Л. Н. Дедова¹, П. А. Семизжон², Ю. Л. Денисова¹, О. В. Кандрукевич¹

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ В ПЕРИОДОНТОЛОГИИ

Аннотация. В настоящее время в Республике Беларусь перспективным направлением в периодонтологии являются разработка, производство и внедрение отечественного экспресс-теста, который даст возможность врачу широко использовать методы микробиологической диагностики в стоматологической практике.

Цель исследования – разработать отечественный экспресс-тест в периодонтологии и обозначить порядок подготовительных клинико-лабораторных мероприятий, используя ПЦР и трипсиноподобную активность периопатогенной микрофлоры (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*).

С использованием методов клинического обследования тканей периодонта проведено стоматологическое обследование 60 пациентов в возрасте 35–44 лет с клиническими признаками генерализованного периодонтита и глубокой патологического зубодесневового кармана 5–6 мм (основная группа) и 140 пациентов в возрасте 20–24 года без признаков болезней периодонта (контрольная группа), обратившихся на 3-ю кафедру терапевтической стоматологии БГМУ. Лабораторная диагностика заключалась в оценке трипсиноподобной активности периопатогенной микрофлоры с помощью ПЦР.

Предложен алгоритм подготовительных клинико-лабораторных мероприятий в диагностике болезней пародонта, включающий забор материала и выявление в образце паропатогенных микроорганизмов с использованием биохимического метода; забор материала, его консервация и хранение для исследования методом количественной ПЦР; выявление генетического материала паропатогенных микроорганизмов методом количественной ПЦР в режиме реального времени.

Основные принципы микробиологической диагностики в пародонтологии дают возможность достоверно поставить диагноз, планировать лечение и оценивать его результаты.

Изучено содержимое десневой борозды и/или пародонтального кармана у пациентов с болезнями пародонта. Для извлечения содержимого из пародонтального кармана у пациентов с болезнями пародонта наиболее рациональным является использование бумажного шпигета как стоматологического инструмента.

При разработке отечественного экспресс-теста в пародонтологии целесообразным представляется проведение подготовительных клинико-лабораторных мероприятий с использованием ПЦР и оценка трипсиноподобной активности паропатогенной микрофлоры (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*).

Ключевые слова: экспресс-диагностика, пародонтология, клинико-лабораторная диагностика, ткани пародонта

Для цитирования: Особенности экспресс-диагностики в пародонтологии / С. П. Рубникович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 196–203 (на англ. яз.). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-196-203>

Introduction. Currently, a range of advanced innovative clinical and experimental studies that enable further improvement of diagnosis and prognosis can be justified and implemented in the Republic of Belarus, which reduces the treatment period, decreases the number of visits to the dentist, as well as prolongs and stabilises the remission of dental diseases [1–4].

The new technologies for diagnosis of periodontal diseases in clinical periodontology become of special importance. In this connection, detailed diagnosis indicators for obtaining comprehensive information on the dental status makes it possible to identify the disease at different stages of its development and to plan comprehensive treatment and prevention efficiently [5–7].

In a balanced dynamic system of periodontium, the dental crown surrounding is represented by a diverse microbial environment. The aggressive oral cavity environment includes potential pathogens, possible virulent versions and foreign microorganisms. The negative impact of the dental plaque disturbs, sometimes, the balance between the surrounding of the dental crown and of the dental root, leading to periodontal tissue changes [8].

It should be remembered that the quality of diagnosis depends on the differential methodology of clinical and laboratory examination, as well as on the compliance with the basic principles of microbiological studies in periodontology [9].

The traditional clinical diagnosis of periodontal diseases is based on the clinical dental examination and monitoring of the hygienic status of the oral cavity, gums, periodontal ligament, alveolar bone and the microcirculation conditions. The efficient diagnosis of periodontal diseases includes the determination of the quantitative and qualitative compositions of the oral cavity microflora. Globally, the following laboratory methods are used for identifying periodontal microorganisms: bacteriological, microscopic, immunological and molecular diagnosis, as well as biochemical determination of microorganism fermentation action markers and tissue destruction and inflammation markers [10–14].

Different diagnosis tests are chosen and used depending on the possibilities of early diagnosis prior to the development of disease signs, high prognosis value of the analysis, test availability and its cost effectiveness. It should be mentioned that the majority of the mentioned methods require special laboratory conditions, skilled and trained staff, hard-to-get equipment as well as specific conditions for bio-material transportation. The duration of laboratory tests can be from several hours (for instance, PCR, provided the samples are transported to the diagnosis laboratory immediately) to several days (culture methods), which results in delayed healthcare, higher numbers of visits, prolonged treatment and higher costs of treatment. Among the tests based on determining the microorganism fermentation action markers, the most widely used is the BANA test, since it can be performed by the dentist in real time. The obvious advantages of this test are its availability and simplicity, high prognosis value of the analysis, minimal invasiveness, as well as high specificity and sensitivity. This scales up the rapid diagnosis opportunities during the visit to the dentist.

The BANA test is based on its unique capacity for rapid identification of periopathogenic gram-negative anaerobic bacteria of the red complex (*P. gingivalis*, *T. denticola* and *B. forsythus*). It should be

mentioned that this test does not allow an accurate quantitative assessment of bacteria, neither it indicates which of the three bacteria is prevailing. However, its advantage lies in that the dentist is able to identify during a short visit of the patient, whether the analysed material contains a diagnostically significant quality of periopathogenic microorganisms (*P. gingivalis*, *T. denticola* and *B. forsythus*), which is very valuable for dental and interdisciplinary diagnosis, prognosis and prevention of dental diseases. At the same time, the BANA test can be used for assessing the efficiency of the actual dental treatment, for example, scaling, root smoothing, use of antimicrobial preparations for treatment of periodontal diseases, oral mucosa diseases, halitosis and other conditions of the oral cavity [15].

At the same time, it is very important to develop and produce a domestic test for rapid diagnosis, prognosis and rational treatment of periodontal diseases. Therefore, the obvious promising lines for development of microbiological diagnosis in dentistry and the development and introduction of screening and rapid tests will enable the dentist to apply them in dental practices on a broad scale.

The goal of the study – to develop a domestic rapid test for periodontology, indicating the procedure for preparatory clinical and laboratory measures using PCR and trypsin-like activity of periopathogenic microflora (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus*).

Materials (objects) and research methods. The preparatory clinical and laboratory studies were conducted by Chair of Therapeutic Dentistry No. 3 of the Belarusian State Medical University and the Republican Scientific and Practical Centre of Epidemiology and Microbiology [16].

Clinical studies. The researchers performed calibration according to the international standard.

Before the study, the patients gave their voluntary informed consent for diagnosis procedures and personal data processing. Dental examination was performed in 60 patients who had clinical signs of generalized periodontitis and a 5–6 mm deep pathological dentogingival pocket (PDGP), aged 35–44 (the main group), and 140 patients without signs of periodontal diseases, aged 20–24 (the control group) (Tab. 1).

In selecting dental tools for extraction of the content from the dentogingival pocket, PCR diagnosis was used to identify the genetic material of periopathogenic microorganisms, such as *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus*, using specific oligonucleotides (primers) and labelled hybridization samples, a complementary sequence of gens 16S of ribosomal genome RNA of these excitors. Totally, 1260 samples were prepared for PCR diagnosis.

This work was performed using clinical and tool methods for assessing the status of hard tooth tissues, periodontium, oral cavity hygiene, including the simplified oral hygiene index OHI-S (I. G. Green, I. R. Vermillion, 1964), the plaque thickness index (PLI) (J. Silness and H. Loe, 1964), the gingival index (GI) (H. Loe, J. Silness, 1963), papillary-marginal-alveolar index (IPMA) (M. Massler, J. Shour, C. Parma, 1960), periodontal index (PI) (A. L. Russel, 1956, 1967), the index of gingival recession (IR) (S. Stahl, A. Morris, 1955), X-ray diagnosis methods, as well as their statistical processing.

First, supragingival dental calculus was removed mechanically; then the content of the gingival sulcus and/or the periodontal pocket was removed in the area of the medial vestibular surface of the first maxillary molar.

Table 1. Index indicators for assessing the state of periodontal tissues in patients of the main and control groups (M ± m)

Clinical indicator	Main group	Control group
Probing depth, mm	5.2 ± 0.18	2.7 ± 0.16
OHI-S, score	0.59 ± 0.11	0.57 ± 0.08
PLI, score	0.78 ± 0.15	0.77 ± 0.13
GI, score	1.86 ± 1.28	0.75 ± 0.09
IPMA, %	35.82 ± 2.31	7.57 ± 0.45
PI, score	2.77 ± 1.13	0.09 ± 0.07
IR, %	34.73 ± 2.98	18.95 ± 2.15

For removing the periodontal pocket content, the following sterile tools were used in the study: a dental probe, a dental excavator no. 1, a periodontal probe (WHO), a periodontal probe (North Carolina), a dental brush, and a paper pin. The tool was inserted into the periodontal pocket for 10 sec; then the pins or the biomaterial from the probes, the excavator and the dental brush were placed in a test tube

with the sterile saline solution (150 μ l) and sent for freezing and storage pending their transportation to the laboratory.

The laboratory tests. The laboratory diagnosis was made using PCR, and trypsin-like activity of the biological samples was assessed.

DNAs were extracted from the clinical material by means of commercial sets RIBO-prep, Russian Federation, and NK-extra, Republic of Belarus.

The following oligonucleotides (primers) and hybridization samples were used for qualitative and quantitative PCR:

PG-F: GCGCTCAACGTTTCAGCCT;

PG-R: CACGAATTCCGCCTGCC;

PG_FAM: FAM-GGCAGTTTCAACGGC-BHQ;

TF-F: TGAAAGTTTGTCTGCTTAACGATAAAA;

TF-R: TCGTGCTTCAGTGTCAGTTATACCT;

TF_ROX: ROX-CATTCCGCCTACTTCATC-BHQ2;

TD-F: CTTCCGCAATGGACGAAAGT;

TD-R: CAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA;

TD_By-5: By5-GTAAAATTCTTTTGCAGATGAAG-BHQ2.

The standard samples for quantitative identification of periopathogenic microorganisms (*T. denticola*, *P. gingivalis* and *B. forsythus*) included the recombinant plasmid DNAs: pJET1.2/blunt/PG., pJET1.2/blunt/BF, pJET1.2/blunt/TD, obtained at the previous research stages. Two standard samples (calibrators) were used for each exciter: $3.5 \cdot 10^7$ and $1.3 \cdot 10^3$ gEq/ml for identification and quantitative analysis of *T. denticola*, $2.6 \cdot 10^6$ and $2.6 \cdot 10^3$ gEq/ml for identification and quantitative analysis of *B. forsythus*.

The PCR mix for qualitative and quantitative identification of periopathogenic microorganisms (*T. denticola*, *P. gingivalis* and *B. forsythus*) included the following components calculated per reaction: Primer PG-F (0.5 μ M), Primer PG-R (0.5 μ M), Probe PG_FAM (0.4 μ M), Primer TF-F (0.5 μ M), Primer TF-R (0.5 μ M), Probe TF_ROX (0.2 μ M), Primer TD-F (0.5 μ M), Primer TD-R (0.5 μ M), Probe TD_By-5 (0.4 μ M), dNTP mix (0.2 mM), Taq-buffer ($\times 1$), $MgCl_2$ (4 mM), Taq-polimerase (2,5 ME), H_2O (mQ) to have the final volume of the reaction mix 40 μ l. The volume of the introduced DNA was 10 μ l. The amplification mode: 1. 95 $^{\circ}C$ for 3 min; 2. 94 $^{\circ}C$ for 15 sec, 54 $^{\circ}C$ for 30 sec, 72 $^{\circ}C$ for 45 sec, the number of cycles is 45.

The real-time analysis of the amplification results was made by means of the software of the amplification device with the optical module IQ 5 (Bio-Rad, USA). Curves of the fluorescent signal accumulation in the channels FAM, ROX and Cy5 were analysed to record the accumulation of DNA fragment amplification products

The solutions and reagents for biochemical assessment of trypsin-like activity of the pathogen periodontal microflora.

The following types of substrates for proteolytic enzymes were used: N-benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide (BANA) and N α -benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA). 67 mM solutions of these substrates were used for the reaction. The 0.2 % solution Fast K Black Salt (KP) was used as a dye. The main strip was prepared using a nitrocellulose chromatographic membrane (manufactured by the Glory Science Co., Ltd.) as substrate-impregnated material. The auxiliary strip, impregnated with the dye solution, was prepared using the filter paper according to State Standard GOST 12026-76. The basis for both strips was a PVC sheet with a self-adhesive surface on one side (manufactured by the Glory Science Co., Ltd.).

Results and its discussion. Our clinical experience was used to identify modern clinical and laboratory principles of microbiological diagnosis in periodontology.

Basic clinical and laboratory principles of microbiological diagnosis in periodontology:

selection of the investigation object;

selection of the adequate diagnosis;

selection of the investigation method;

competence of the microbiological diagnosis results in periodontology.

Given the specific characteristics of periodontal tissues, oral cavity microflora and clinical manifestations of periodontal diseases, it is expedient to investigate the content of the gingival sulcus and/or the

periodontal pocket. In this case, it is important to select adequate diagnosis means, since it defines the quality and quantity of the obtained investigation material. Multiple and contradictory data are available that indicate to the lack of a unified methodology for a comprehensive evaluation of the periodontium biological system, including the microbial environment. At the same time, investigation of the periodontal pocket requires high sensitivity and specificity and application simplicity. Analysis of the microbiological study outcomes depends on the level of development of molecular biological methods and the information communication technologies. In this case, the ethical and deontology competences determine the high level of awareness in the issues of microbiology and periodontology and, in general, of the interdisciplinary approach in diagnosis, treatment and prevention of periodontal diseases.

The above enumerated clinical and laboratory principles of microbiological diagnosis in periodontology enable the dentist to obtain true diagnosis results, make correct diagnosis and apply efficient treatment and prevention measures in 98 % of cases.

Thus, we present the results of use of various tools for the extraction of the content from the periodontal pocket by the threshold cycle (Ct) values (Tab. 2).

Table 2. Selection of rational dental tools for extracting the content from the pathological dentogingival pocket ($M \pm m$)

The tool for extracting the periodontal pocket content	Threshold cycle (Ct) values in the FAM channel for the studied samples		
	PCR mix 1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	PCR mix 2 <i>Treponema denticola</i>	PCR mix 3 <i>Bacteroides forsythus</i>
Paper pin	24.94 ± 0.23	27.42 ± 0.38	25.76 ± 0.75
Periodontal probe, WHO	34.35 ± 0.32	41.70 ± 0.9	35.71 ± 0.52
Periodontal probe, North Carolina	35.53 ± 0.61	39.05 ± 0.19	35.42 ± 0.63
Dental probe	36.01 ± 0.13	37.45 ± 0.64	36.38 ± 0.45
Dental brush	31.90 ± 0.73	38.88 ± 0.87	30.27 ± 0.93
Dental excavator	36.65 ± 0.29	43.57 ± 0.63	32.64 ± 0.82

The results of PCR diagnosis identified the following anaerobic pathogenic microorganisms: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Bacteroides forsythus*. This reaction is qualitative without identification of the reliable quantity of microorganisms in the investigated samples (by the value of the fluorescence threshold (Ct), obtained for each positive result). Comparing them for one and the same reaction, it can be concluded that the samples with smaller values Ct have higher original quantities of the exciter's genetic material.

The use of all dental tools, included into the research, enabled obtaining a biological material, containing the microorganism DNAs. It should be noted that the greatest quantity of microorganism DNAs was identified in the samples, selected by means of a paper pin. Therefore, we recommend selecting the tools by the decrease of the material DNA: a paper pin, a dental brush (size 0), a periodontal bulbous-end probe (WHO), a periodontal probe (North Carolina), and a dental excavator no. 1.

Qualitative and quantitative PCR analysis of *T. denticola*, *P. gingivalis* and *B. forsythus* in biological samples from PDGP of patients who had periodontitis. For identification and quantitative identification of the genetic material of periopathogenic microorganisms (*T. denticola*, *P. gingivalis* and *B. forsythus*), DNAs were extracted, followed by PCR. The control samples (standards) were the plasmid DNAs obtained at the previous stages of research: pJET1.2/blunt/PG., pJET1.2/blunt/BF, pJET1.2/blunt/TD. The initial number of plasmid DNAs was determined by means of spectrophotometry, followed by recalculation per number of copies by the formula $k = (m \cdot N_A) / (1 \cdot 10^9 \cdot 650)$, where k is the number of molecules (copies) of the plasmid DNA in the preparation, m is the weight of DNA (ng), N_A is Avogadro constant ($6.023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), 1 is the size of the plasmid DNA (bp), 10^9 is the factor of conversion of ng to g, 650 is the molecular weight 1 bp in daltons.

This formula was used to make quantitative calculations for each plasmid DNA with a series of consecutive ten-fold dilutions: from $3.5 \cdot 10^8$ and $3.5 \cdot 10^2$ gEq/ml for pJET1.2/blunt/PG, from $1.3 \cdot 10^8$ and $1.3 \cdot 10^2$ gEq/ml for pJET1.2/blunt/TD, and from $2.6 \cdot 10^8$ and $2.6 \cdot 10^2$ gEq/ml for pJET1.2/blunt/BF.

Thereafter, the obtained plasmid DNAs in the concentrations $3.5 \cdot 10^7$ and $3.5 \cdot 10^3$ gEq/ml for pJET1.2/blunt/PG (*P. gingivalis*), $1.3 \cdot 10^5$ and $1.3 \cdot 10^3$ gEq/ml for pJET1.2/blunt/TD (*T. denticola*) and $2.6 \cdot 10^6$ and

$2.6 \cdot 10^3$ gEq/ml for pJET1.2/blunt/BF (*B. forsythus*) were used as standard control samples (calibrators) for quantitative assessment of DNAs *T. denticola*, *P. gingivalis* and *B. forsythus* in the clinical samples taken from the patients. Tab. 3 shows the results of quantitative identification of periopathogenic microorganisms in the clinical samples from the patients; the comparison set was the commercial preparation “Dentoscreen”, manufactured by the “Lytech”.

Table 3. Results of quantitative identification of periopathogenic microorganisms by PCR in real time

Sample nos.	Using an optimized PCR mix and the obtained standard samples (gEq/ml)			Using the commercial preparation “Dentoscreen”, manufactured by the “Lytech” (gEq/ml)		
	PG (FAM)	TD (Cy5)	BF (ROX)	PG (FAM)	TD (FAM)	BF (FAM)
34	$1.19 \cdot 10^5$	–	$1.15 \cdot 10^4$	$1.52 \cdot 10^5$	–	$1.27 \cdot 10^4$
35	–	–	$8.92 \cdot 10^1$	–	–	$7.88 \cdot 10^1$
36	–	–	$8.14 \cdot 10^1$	–	–	$7.95 \cdot 10^1$
38	$3.7 \cdot 10^1$	–	–	$4.56 \cdot 10^1$	–	–
39	–	–	$5.06 \cdot 10^3$	–	–	$5.37 \cdot 10^3$
40	–	–	$5.5 \cdot 10^2$	–	–	$3.78 \cdot 10^2$
41	–	–	$9.05 \cdot 10^3$	–	–	$8.43 \cdot 10^3$
42	–	–	$2.77 \cdot 10^2$	–	–	$2.81 \cdot 10^2$
St 1	$3.5 \cdot 10^7$	$1.3 \cdot 10^7$	$2.6 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^7$	$3.0 \cdot 10^7$	$8.76 \cdot 10^6$
St 2	$3.5 \cdot 10^5$	$1.3 \cdot 10^5$	$2.6 \cdot 10^3$	$7.9 \cdot 10^4$	$1.2 \cdot 10^5$	$2.9 \cdot 10^4$

Comparable results of quantitative identification of DNA of periopathogenic microorganisms were obtained for all investigated samples, both using an optimized PCR mix and the obtained standard control samples and the commercial diagnosis preparation.

The biochemical reaction for detection of trypsin-like ferments in reactions with different synthetic substrates. The basic feature in the development of biochemical/enzyme tests for periodontitis diagnosis is the unique capacity of periopathogenic gram-negative anaerobic bacteria of the red complex, including *P. gingivalis*, *T. denticola* and *B. forsythus*, i. e., the capacity to manifest trypsin-like activity in relation to synthetic derivatives of β -naphthylamide. It was established and demonstrated that the red complex bacteria are capable of hydrolysing a number of compounds (substrates), in particular, N- α -benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide (BANA) and N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA), generating the final reaction product which can be visualised by introducing the relevant dye. Based on these data, we optimised the biochemical reaction for identification of trypsin-like ferments in the initial investigated material using various substrates. The fermentation reaction was performed in the solution and on different types of membranes. For this reaction, we used 67 mM solutions of N-benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide (BANA) and N- α -benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) as substrates for proteolytic enzymes. The dye was 0.2 % Fast K Black Salt (KP) solution.

In the reaction using N- α -benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) as the substrate, the solution manifested a subtle straw change in the modified colour after the introduction of the dye. In this case, the ratio BAPNA/trypsin (2 mg/ml) was 4:1. The reaction products were visualized 5 min later by introducing the dye until a stable colour was obtained. The reaction on a chromatographic membrane did not colour the fermentation reaction area (the control was trypsin from 3 to 10 μ g) after incubation with the dye.

During the reaction using N-benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide (BANA) as the substrate, after the introduction of trypsin (3 μ g) and subsequent incubation with the dye in the area of substrate fermentative degradation, we recorded a coloured complex of various intensities depending on the substrate used for the auxiliary strip (with the dye). The highest coloration intensity and, hence, the reaction efficiency were observed when the filter paper per GOST 12026-76 was used as the base for the dye impregnation, as compared to the blotting paper P-4681 Sigma and the filter paper BR 7289022 (Bio-Rad, USA).

Afterwards, test strips were prepared that allowed investigating up to five samples at a time. For positive control, trypsin was placed on the membrane with the substrate in the respective region, which was visualized together with the investigated samples after incubation with the dye placed on the auxiliary

strip. Figure 5 shows the results of identification of periopathogenic microorganisms *P. gingivalis*, *T. denticola* and *T. forsythia* in clinical samples taken from patients (the content of the dentogingival pocket) who had clinically diagnosed chronic generalized periodontitis. In this case, the content of the dentogingival pockets, extracted by means of paper pins, was placed directly on the designated reaction area of the main strip.

Following the application of the samples and incubation with the dye in the respective area it was possible to visualize grey-blue strips of various intensities, testifying to the presence of periopathogenic microorganisms in the sample. For positive control, we visualized a grey-blue strip in the reaction control area.

The algorithm of sample preparation and laboratory diagnosis of the periodontal tissues in patients with periodontitis, using a PCR and a biochemical rapid test based on the assessment of trypsin-like activity of biological samples. The algorithm of sample preparation and laboratory diagnosis of periodontitis (hereinafter, the algorithm), using a PCR method and assessment of trypsin-like activity of biological samples, means a sequence of actions that define the procedure of sampling biological material from patients who have periodontitis or who are suspected to develop inflammatory processes related to anaerobic microflora, and its further investigation by means of biochemical method and a real-time quantitative PCR method.

This algorithm includes the following stages:

sampling the material and identifying periopathogenic microorganisms *T. denticola*, *P. gingivalis* and *B. forsythus* in the sample by means of a biochemical method;

sampling the material and its preservation and storing to be analysed by the quantitative PCR;

identifying the genetic material of the periopathogenic microorganisms *T. denticola*, *P. gingivalis* and *B. forsythus* by the real-time quantitative PCR.

The preparation stage includes the mechanical removal of supragingival dental calculus followed by extraction of the content from the gingival sulcus and/or the periodontal pocket in the area of the medial vestibular surface of the first maxillary molar. The periodontal pocket content is removed using sterile dental paper pins. The paper pin is inserted into the periodontal pocket for 10 sec; then it is withdrawn and used for direct biochemical identification of periopathogenic microorganisms *T. denticola*, *P. gingivalis* and *B. forsythus* by means of the biochemical rapid test; and placed to a micro test tube with a sterile saline solution to store at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and to be transported to the laboratory for identification of genetic material of the periopathogenic microorganisms *T. denticola*, *P. gingivalis* and *B. forsythus* by means of the real-time quantitative PCR.

Conclusions

1. The basic principles of microbiological diagnosis in periodontology enable making a true diagnosis, planning treatment and assessing treatment results.

2. The competence in selecting the investigation object testifies to the need of studying the content of the gingival sulcus and/or the periodontal pocket in patients who have periodontal diseases. It was noted that the most rational tools for removing the periodontal pocket content in patients who have periodontal diseases was a paper pin.

3. The development of a domestic express test in periodontology demonstrated the need of preparatory clinical and laboratory activities using PCR and trypsin-like activity of periopathogenic microflora (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*).

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

References

1. Dedova L. N., Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Kandrukevich O. V., Solomevich A. S., Rosenik N. I. Prevalence of dental diseases in the Republic of Belarus. *Stomatologiya. Estetika. Innovatsii* [Dentistry. Aesthetics. Innovation], 2017, vol. 1, no. 2, pp. 193–202 (in Russian).
2. Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Vladimirskaia T. E., Andreeva V. A., Kvacheva Z. B., Panasenkova G. Yu., Volotovskii I. D. Regenerative cell technologies for gingival recession treatment. *Sovremennye tekhnologii v meditsine* [Modern technologies in medicine], 2018, vol. 10, no. 4, pp. 94–104 (in Russian).
3. 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>

4. Rubnikovich S. P., Maizet A. I., Denisova Yu. L., Kopylova I. A., Avanesyan R. A. The effect of magnetophototherapy on morphological changes of tissues of pathologically changed periodontium. *Medical news of North Caucasus*, 2017, vol. 12, no. 3, pp. 303–307. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12095>
5. Fomin N. A., Rubnikovich S. P., Bazylev N. B. New possibilities of investigating blood flow in soft tissues of the mouth. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2008, vol. 81, no. 3, art. 533. <https://doi.org/10.1007/s10891-008-0065-9>
6. 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. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 20–27 (in Russian).
7. 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).
8. Dedova L. N., Denisova Yu. L., Solomevich A. S., Kandrukevich O. V., Shul'gan S. V., Semizhon P. A., Apanasovich M. V., Rubnikovich S. P. Competencies of clinical and laboratory diagnostics in periodontology. *Stomatologiya. Estetika. Innovatsii* [Dentistry. Aesthetics. Innovation], 2019, no. 4, pp. 451–457 (in Russian).
9. Dedova L. N., Denisova Yu. L., Solomevich A. S., Kandrukevich O. V., Semizhon P. A., Apanasovich M. V. Features of clinical and laboratory diagnostics in periodontology. *Stomatolog* [Stomatologist], 2019, no. 3 (34), pp. 22–28 (in Russian).
10. Dedova L. N., Denisov L. A. The treatment of apical periodontitis by using combined exposure to focal measured vacuum and local d'Arsonval treatment. *Stomatologiya* [Dentistry], 1991, vol. 70, no. 1, pp. 26–27 (in Russian).
11. 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 maxillo-dental system. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2017, vol. 90, no. 6, pp. 1513–1523. <https://doi.org/10.1007/s10891-017-1713-8>
12. 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).
13. Hockensmith K., Dillard K., Sanders B., Harville B. A. Identification and characterization of a chymotrypsin-like serine protease from periodontal pathogen, *Tannerella forsythia*. *Microbial Pathogenesis*, 2016, vol. 100, pp. 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.041>
14. Fujinaka H., Takeshita T., Sato H., Yamamoto T., Nakamura J., Hase T., Yamashita Y. Relationship of periodontal clinical parameters with bacterial composition in human dental plaque. *Archives of Microbiology*, 2013, vol. 195, no. 6, pp. 371–383. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0883-9>
15. Loesche W. J., Lopatin D. E., Giordano J., Alcoforado G., Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, vol. 30, no. 2, pp. 427–433. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.2.427-433.1992>
16. Dedova L. N., Kandrukevich O. V., Semizhon P. A., Scheslenok E. P., Burdeiko E. Yu., Poddubnov S. V. Preparatory measures in laboratory express diagnostics of the state of periodontal tissues. *Stomatolog* [Stomatologist], 2020, no. 3 (38), pp. 8–17 (in Russian).

Information about the authors

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

Liudmila N. Dedova – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Dedova.bsmu@mail.ru

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

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

Olga V. Kandrukevich – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kondruk@mail.ru

Информация об авторах

Рубникович Сергей Петрович – д-р мед. наук, профессор, ректор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rubnikovich@mail.ru

Дедова Людмила Николаевна – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Dedova.bsmu@mail.ru

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

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

Кандрукевич Ольга Викторовна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kondruk@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 612.014.461.3:612.014.461.3]:616.155.194

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-204-211>

Поступила в редакцию 27.08.2020

Received 27.08.2020

Е. В. Босякова, Э. П. Титовец

*Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии,
Минск, Республика Беларусь*

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В КЛИНИКЕ, НА АКТИВНОСТЬ AQP1 МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. С использованием метода остановленного потока и на основе исследования интенсивности светорассеяния изучено действие применяемых в клинике фармакологических препаратов на водный обмен эритроцитов человека, катализируемый аквапорином AQP1. Установлено, что примененные в терапевтических концентрациях лекарственные средства оказывают разной степени выраженности ингибирующее влияние на водную проницаемость мембраны эритроцитов. Полученные результаты расширяют представление о молекулярном механизме действия исследованных нами препаратов. С учетом широкого распространения AQP1 в различных тканях человека эти данные следует принимать во внимание при проведении терапевтических мероприятий, направленных на нормализацию водного обмена органов и тканей.

Ключевые слова: эритроциты, AQP1, фармакологические препараты, водный обмен тканей, кинетика набухания эритроцитов

Для цитирования: Босякова, Е. В. Исследование действия некоторых препаратов, применяемых в клинике, на активность AQP1 мембраны эритроцитов человека / Е. В. Босякова, Э. П. Титовец // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 204–211. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-204-211>

Katerina V. Basiakova, Ernst P. Titovets

Republican Research and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Republic of Belarus

STUDY OF THE EFFECT OF SOME DRUGS USED IN THE CLINIC ON THE AQP1 ACTIVITY OF THE HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE

Abstract. Using the stopped flow method and based on the study of the intensity of light scattering, the effect of pharmacological preparations used in the clinic on the water exchange of human erythrocytes, catalyzed by aquaporin AQP1, was studied. Pharmacological preparations used in therapeutic concentrations have a variable inhibitory effect on water permeability of the erythrocyte membrane. The obtained results broaden our understanding of the molecular action mechanism of the investigated drugs. In view of the wide distribution of AQP1 in various human tissues, these data should be taken into account when carrying out therapeutic measures aimed at normalizing the water exchange of organs and tissues.

Keywords: red blood cells, AQP1, tissue water metabolism, pharmacological preparations, kinetics of erythrocyte swelling

For citation: Basiakova K. V., Titovets E. P. Study of the effect of some drugs used in the clinic on the AQP1 activity of the human erythrocyte membrane. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 204–211 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-204-211>

Введение. Основная роль в регуляции водного обмена принадлежит водным каналам – аквапоринам. В их число входит и AQP1, который экспрессируется в ряде тканей организма, включая нервную систему. В головном мозге AQP1 встроен в апикальную мембрану эпителиальных клеток хориоидального сплетения, где принимает участие в секреции цереброспинальной жидкости [1]. Водные каналы представляют единое функциональное целое с интерстициальным пространством, нанофлюидным доменом, головного мозга [2, 3]. С движением интерстициальной и цереброспинальной жидкостей связаны доставка лекарственных препаратов в различные отделы головного мозга, миграция клеток злокачественных опухолей, стволовых клеток, образование и выведение отложений β -амилоида [4, 5].

AQP1 широко представлен в организме человека: он экспрессируется в эритроцитах, в эпителии почечных канальцев и пигментном эпителии сетчатки, в радужке, хрусталике, сердце, лег-

ких, скелетных мышцах, почках, поджелудочной железе, в эндотелии многих внутренних органов [6–9]. AQP1 является главным водным каналом, обеспечивающим концентрационную способность почки. Ингибирование этого канала сопровождается повышением диуреза, как это происходит под действием фуросемида, широко применяемого в клинике. В больших количествах AQP1 обнаруживается в апикальной и базолатеральной мембранах эпителиальных клеток проксимального канальца и тонкого нисходящего сегмента петли Генле [10–12].

В многочисленных исследованиях последнего десятилетия показано, что аквапорины играют важную роль в патогенезе злокачественных опухолей головного мозга. При многих патологиях обнаруживается не характерная для головного мозга локализация AQP1. Экспрессия этого водного канала значительно повышается в эндотелии микрососудов опухоли. AQP1 принимает участие в обеспечении подвижности клеток опухоли, ее инвазивности, образовании отека и регуляции метаболизма опухолей в условиях локальной гипоксии [13, 7, 14]. Экспрессия AQP1 коррелирует с уровнем злокачественности опухоли, интенсивностью ангиогенеза, инвазивностью опухоли и ее инфильтрацией. Подавление экспрессии AQP1 рассматривается как способ уменьшения инвазивности клеток глиомы [14–17].

В мембранах эритроцитов эпитоп полипептидной цепи AQP1 представляет собой групповой антиген крови и обозначается как «фактор Колтона» [7]. Установлены две аллели – Co(a) и Co(b). Аллель Co(a) имеют 99,8 % людей. Исключительно редко AQP1 полностью отсутствует (Co(a-b-)). AQP1 участвует в газообмене и переносит воду через клеточную мембрану в направлении осмотического градиента. Функциональный анализ водной проницаемости эритроцитов с Co(a-b-) показал, что AQP1 обеспечивает более 85 % осмотической проницаемости эритроцитарной мембраны [18, 19]. Применяемые в клинике фармакологические препараты, попадая в кровь, могут непосредственно воздействовать на AQP1 эритроцитарной мембраны. Изменение объема эритроцитов, где осуществляется трансмембранный перенос, катализируемый AQP1, имеет место при реализации собственно физиологической функции эритроцитов.

С учетом широкого органного и тканевого распределения аквапорина AQP1 встает практически важный вопрос, как действуют применяемые в клинике фармакологические препараты на AQP1.

Цель нашей работы – изучить влияние применяемых в клинике фармакологических препаратов на активность AQP1.

Материалы и методы исследования. В работе использовали эритроциты крови доноров, взятой с добавлением гепарина или цитрата. Изотонический буферный раствор следующего состава: NaCl – 84 мМ, Na_2HPO_4 – 21 мМ, NaH_2PO_4 – 8,3 мМ, CaCl₂ – 10 мМ, глюкоза – 4 мМ (рН = 7,38). Температура 24 °С. Эритроциты отмывали и разводили до конечной концентрации 0,15 млн/л. Количество эритроцитов, содержание гемоглобина и других гематологических параметров крови определяли на гематологическом анализаторе Nihon Kohden MEK 7222 (Япония).

Изучено действие таких препаратов, как дексаметазон, преднизолон, допамин, норадреналин, димедрол, пропофол, севофлуран, кеторол, фуросемид, эмоксипин, атропин.

Концентрацию лекарственного средства рассчитывали, исходя из средней терапевтической дозы. Эритроциты в изотоническом буфере 15 мин инкубировали с препаратом соответствующей концентрации. Для контроля скорости набухания использовали чистую суспензию эритроцитов в буферном растворе, для контроля ингибирования водного обмена – HgCl₂ в концентрации 10 мМ.

Кинетику водной проницаемости мембраны эритроцитов исследовали методом остановленной струи (Stop-flow) на дифференциальном спектрофотометре UV-VIS-NIR Cary 5000 (Великобритания) в комплексе с модулем для быстрого смешивания растворов (RX2000) при длине волны $\lambda = 540$ нм. Для обработки результатов, представленных в цифровом формате (ASCII.txt), использовали программы MS Excel, TableCurve 2D, Graph.

Результаты и их обсуждение. Действие фармакологических препаратов на активность AQP1 мембраны оценивали с помощью технологии остановленного потока (рис. 1). Результаты этих исследований представлены в таблице и на рис. 2.

Хлорид ртути снижает проницаемость мембраны эритроцитов на 95 % относительно контроля. Этот вполне ожидаемый эффект объясняется образованием комплекса ртути с тиольной группой канала AQP1, что сопровождается замедлением переноса воды.

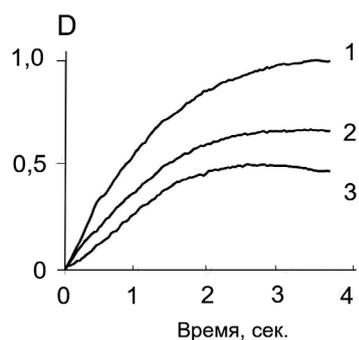


Рис. 1. Графическое отображение кинетических кривых набухания эритроцитов (1 – с водой, 2 – в присутствии преднизолона, 3 – в присутствии димедрола). D – оптическая плотность

Fig. 1. Graphic presentation of the erythrocyte swelling curves (1 – with water, 2 – with prednisolone, 3 – with diphenhydramine). D – optical density

молекулам, которые являются ингибиторами AQP1 [24]. Наши исследования показывают, что применение фуросемида снижает водную проницаемость мембран эритроцитов практически на 50 %.

В клинике широко используются гормональные препараты широкого спектра фармакологического действия, такие как преднизолон, дексаметазон, допамин и норадреналин. Кортикостероиды активируют метаболические транспортные переносы, что способствует повышению экспрессии AQP1. Повышение экспрессии AQP1 под действием дексаметазона рассматривается как способ фармакологической регуляции скорости переноса воды через брюшину [20, 21]. Другие гормональные препараты могут понижать уровень mRNA *aqp*, что в свою очередь снижает уровень экспрессии водных каналов и определяет механизм действия данных препаратов при отеке головного мозга [22, 23]. Однако остается неясным, какой эффект они оказывают при непосредственном воздействии на AQP1. Наши исследования показали, что все четыре исследуемых гормональных препарата значительно снижают водную проницаемость эритроцитов (на 18,3–46,3 %), при этом наибольшим ингибирующим действием обладает преднизолон (снижение на 46,3 %).

Препарат фуросемид представляет собой петлевой диуретик и широко используется при нарушениях церебрального водного обмена в качестве противоотечного средства. Он относится к малым

Влияние лекарственных средств, применяемых в клинике, на водную проницаемость мембраны эритроцитов

Effect of the clinically used drugs on water permeability of the erythrocyte membrane

Препарат	Снижение водной проницаемости, %
Дексаметазон	18,3
Преднизолон	46,3
Допамин	29,6
Норадреналин	27,9
Димедрол	32,6
Пропофол	24,7
Севофлуран	3,8
Кеторол	22,9
Фуросемид	47,8
Эмоксипин	12,2
Атропин	24,5

Пропофол – препарат, используемый для внутривенного наркоза. Его действующим веществом является 2,6-диизопропилфенол, производное фенола. Являясь векторным ингибитором AQP1, он снижает водную проницаемость эритроцитов на 24,7 %, что вполне совпадает с данными мировой литературы [25–27].

Севофлуран применяется для ингаляционного наркоза. Известно, что данный препарат может увеличивать экспрессию AQP1, способствуя повышению уровня его mRNA [28]. При этом при непосредственном введении в кровь он не оказывает какого-либо значительного влияния на водную проницаемость мембраны эритроцитов (увеличение всего на 3,8 %).

Димедрол (действующее вещество дифенгидрамин) – антигистаминный препарат, который хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер [29]. Он значительно (на 32,6 %) снижает водную проницаемость мембраны эритроцитов.

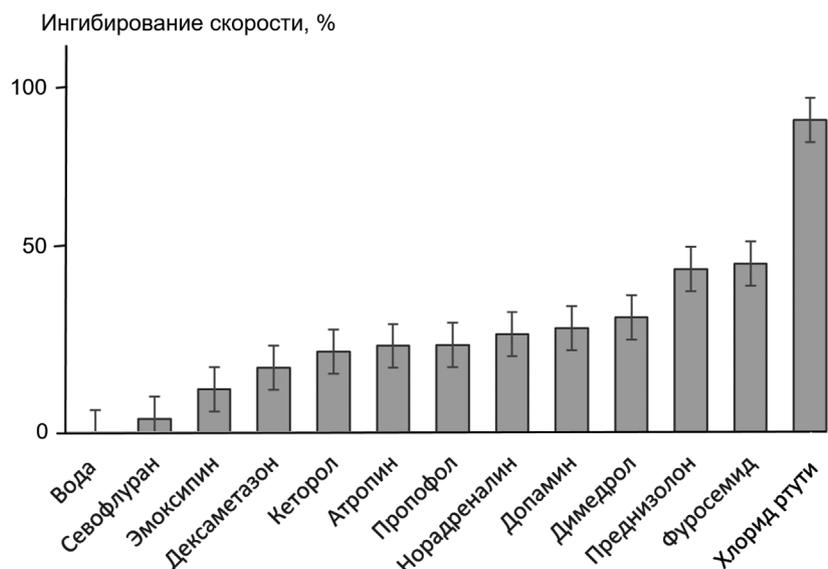


Рис. 2. Действие фармакологических препаратов на скорость набухания эритроцитов

Fig. 2. Effect of pharmacological drugs on the erythrocyte swelling rate

Эмоксипин применяется в качестве антиоксиданта и мембранопротектора при лечении перифокального отека при опухолях и других патологических состояниях, связанных с нарушением водного баланса. Препарат обладает восстановительными свойствами и может использоваться для обращения действия окислителей, ингибирующих AQP1 [30]. При непосредственном воздействии на эритроциты он снижает их водную проницаемость на 12,2 %.

Кеторол, нестероидный противовоспалительный препарат, может подавлять экспрессию водных каналов в клетках Мюллера в условиях гипоксии [31] и снижать водную проницаемость эритроцитов на 22,9 %.

Атропин, блокатор м-холинорецепторов, также в значительной степени замедляет (на 24,5 %) водный обмен эритроцитов.

Среди всех исследованных препаратов не оказывал сколько-нибудь существенного влияния на водную проницаемость мембраны эритроцитов севофлуран. Остальные препараты в разной степени ингибировали активность AQP1. Наиболее выраженным ингибирующим действием обладали преднизолон и фуросемид (понижали водную проницаемость на 46 и 48 % соответственно), что представляет интерес ввиду широкого применения этих препаратов в клинической практике.

В структуру AQP1 входят тиольные группы –SH, располагающиеся внутри просвета водной поры [7]. Их активность подавляется меркуриатами (соединениями ртути) и окислителями (в частности, супероксидным анион-радикалом). Инактивация носит обратимый характер. Диуретические препараты, такие как фуросемид и буметанид, ингибируют активность AQP1 в проксимальных канальцах почки, что сопровождается торможением резорбции воды и возрастанием диуреза. При опухолях головного мозга кортикостероиды оказывают противоотечное действие, что может быть частично обусловлено подавлением экспрессии AQP1 в кровеносных сосудах опухолей, так как его промотор содержит элементы, реагирующие на глюкокортикоиды [32].

К настоящему времени определены три группы малых молекул, относящихся к разным химическим классам, действие которых направлено на аквапорины:

низкомолекулярные модуляторы органической природы, действующие непосредственно на аквапорин;

низкомолекулярные органические модуляторы, препятствующие взаимодействию аутоантител с аквапориновым антигеном;

неорганические ингибиторы и координационные комплексы металлов [33, 34].

Помимо обеспечения водного обмена AQP1 активно участвует в газообмене эритроцитов. Доказательства участия AQP1 в переносе CO_2 были получены в сравнительных исследованиях, выполненных как на нормальных эритроцитах человека, так и на взятых у доноров эритроцитах, у которых фактор Колтона отсутствовал (Колтон-нулевых эритроцитах). Оказалось, что при одинаковом уровне $\text{P}_{\text{HCO}_3^-}$ в обоих типах эритроцитах уровень P_{CO_2} в Колтон-нулевых эритроцитах значительно снижен. При обработке эритроцитов rCMBS, ингибитором аквапорина AQP1, содержащим ртуть, было обнаружено, что этот ингибитор не оказывал заметного эффекта на уровень P_{CO_2} в Колтон-нулевых эритроцитах, однако его воздействие на нормальные эритроциты человека, где присутствовал AQP1, сопровождалось значительным снижением P_{CO_2} в эритроцитах. Таким образом, было показано, что AQP1 является основным каналом переноса CO_2 и его ингибирование ртутьсодержащими препаратами снижает скорость переноса CO_2 на 60 % [35–37].

Существует два основных механизма ингибирования аквапоринов:

генетический, при котором подавляется экспрессия водных каналов, что приводит к уменьшению их количества и, соответственно, к снижению скорости переноса воды;

ингибирование переноса воды через пору аквапорина.

Эффективность препаратов, влияющих на уровень экспрессии аквапоринов путем воздействия на генетический аппарат клетки, проявляется через несколько часов и даже суток. Препараты прямого действия начинают воздействовать на активность AQP1 непосредственно при введении в кровь. Поскольку эритроциты представляют собой высокоспециализированные клетки, не способные к самостоятельному синтезу AQP1, эти клетки являются идеальным модельным объектом для изучения фармакологического действия различных веществ.

Заключение. В клинике при лечении пациентов применяется комплексная терапия, включающая различные препараты как патогенетической направленности, так и относящиеся к симптоматическим средствам. В фармакологических справочниках пока нет информации о действии лекарственных средств на активность AQP1. Отсутствие лечебных рекомендаций, базирующихся на последних научных данных и современном представлении о значении аквапоринов, приводит к затруднениям в выборе оптимального препарата и режима его дозирования. В связи с этим возникает необходимость располагать информацией об их действии на активность аквапоринов и принимать эту информацию во внимание при проведении терапии.

Полученные результаты показывают, что исследованные препараты в терапевтических концентрациях оказывают разной степени выраженности ингибирующее влияние на водную проницаемость мембраны эритроцитов. Предполагается, что вещества, влияющие на проницаемость водных каналов, могут быть потенциальными лекарственными средствами в терапии патологических состояний головного мозга.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Takata, K. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane / K. Takata, T. Matsuzaki, Y. Tajika // Prog. Histochem. Cytochem. – 2004. – Vol. 39, N 1. – P. 1–83. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2004.03.001>
2. Titovets, E. Novel computational model of the brain water metabolism: introducing an interdisciplinary approach / E. Titovets // J. Comp. Biol. Sys. – 2018. – Vol. 2, N 1. – Art. 103.
3. Titovets, E. Nanofluidic approach to brain water metabolism / E. Titovets // Adv. Nanomed. Nanotechnol. Res. – 2019. – Vol. 1. – P. 49–56.
4. The brain interstitial system: Anatomy, modeling, *in vivo* measurement, and applications / Y. Lei [et al.] // Prog. Neurobiol. – 2017. – Vol. 157. – P. 230–246. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.007>
5. Simon, M. J. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease / M. J. Simon, J. J. Iliff // Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis. – 2016. – Vol. 1862, N 3. – P. 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.014>
6. Extrarenal tissue distribution of CHIP28 water channels by *in situ* hybridization and antibody staining / H. Hasegawa [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 1994. – Vol. 266, N 4. – P. C893–C903. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.4.c893>
7. Титовец, Э. П. Аквапорины человека и животных. Фундаментальные и клинические аспекты / Э. П. Титовец. – Минск : Беларус. наука, 2007. – 239 с.
8. Yool, A. J. Aquaporins: multiple roles in the central nervous system / A. J. Yool // Neuroscientist. – 2007. – Vol. 13, N 5. – P. 470–485. <https://doi.org/10.1177/1073858407303081>

9. Yang, B. Erythrocyte water permeability and renal function in double knockout mice lacking aquaporin-1 and aquaporin-3 / B. Yang, T. Ma, A. S. Verkman // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 1. – P. 624–628. <https://doi.org/10.1074/jbc.m008664200>
10. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules / B. M. Denker [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263, N 30. – P. 15634–15642. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)37635-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)37635-5)
11. Higaa, K. Molecular cloning and expression of aquaporin 1 (AQP1) in dog kidney and erythroblasts / K. Higaa, H. Ochiai, H. Fujise // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* – 2000. – Vol. 146, N 2. – P. 374–382. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00218-7](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00218-7)
12. Wintour, E. M. Water channels and urea transporters // E. M. Wintour // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1997. – Vol. 24, N 1. – P. 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1997.tb01775.x>
13. Abbott, N. J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier / N. J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006. – Vol. 7, N 1. – P. 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
14. Титовец, Э. П. Церебральный отек и современные направления его лечения / Э. П. Титовец, А. Ф. Смяянович // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2011. – № 1. – С. 84–94.
15. Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation / E. Steiner [et al.] // *Glia.* – 2012. – Vol. 60, N 11. – P. 1646–1659. <https://doi.org/10.1002/glia.22383>
16. Пархач, Л. П. Новый концептуальный подход к рассмотрению водного обмена головного мозга, церебрально-го отека, гипоксии и ишемии / Л. П. Пархач, Э. П. Титовец // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф. ; Одиннадцатый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 17–20 июня 2014 г., Минск : сб. ст. : в 2 ч. / редкол. : И. Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2014. – Ч. 1. – С. 339–341.*
17. Soveral, G. Aquaporin modulators: a patent review (2010–2015) / G. Soveral, A. Casini // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2017. – Vol. 27, N 1. – P. 49–62. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1236085>
18. Ducza, E. Aquaporins during pregnancy: their function and significance / E. Ducza, A. Csányi, R. Gáspár // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, N 12. – P. 2593. <https://doi.org/10.3390/ijms18122593>
19. The Colton blood group locus. A linkage analysis / K. H. Zelinski [et al.] // *Transfusion.* – 1988. – Vol. 28, N 5. – P. 435–438. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1988.28588337331.x>
20. Corticosteroids induce expression of aquaporin-1 and increase transcellular water transport in rat peritoneum / M. S. Stoenoiu [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – Vol. 14, N 3. – P. 555–565. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000053420.37216.9e>
21. Исследование механизмов кислородного обмена эритроцитов человека / Э. П. Титовец [и др.] // *Medline.ru. Рос. биомед. журн.* – 2009. – Т. 10. – С. 425–441.
22. Dexmedetomidine preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest / X.-D. Ding [et al.] // *Int. J. Neurosci.* – 2016. – Vol. 126, N 3. – P. 249–256. <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1005291>
23. AQP4 expression in striatal primary cultures is regulated by dopamine – implications for proliferation of astrocytes / E. Küppers [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 28, N 11. – P. 2173–2182. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06531.x>
24. AqF026 is a pharmacologic agonist of the water channel aquaporin-1 / A. J. Yool [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2013. – Vol. 24, N 7. – P. 1045–1052. <https://doi.org/10.1681/asn.2012080869>
25. Voigtlaender, J. Transmembrane water influx via aquaporin-1 is inhibited by barbiturates and propofol in red blood cells / J. Voigtlaender, B. Heindl, F. B. Becker // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 366, N 3. – P. 209–217. <https://doi.org/10.1007/s00210-002-0580-8>
26. Propofol administration modulates AQP-4 expression and brain edema after traumatic brain injury / Z. Ding [et al.] // *Cell Biochem. Biophys.* – 2013. – Vol. 67, N 2. – P. 615–622. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9549-0>
27. Propofol pretreatment attenuates aquaporin-4 over-expression and alleviates cerebral edema after transient focal brain ischemia reperfusion in rats / Y. Y. Zheng [et al.] // *Anesth. Analg.* – 2008. – Vol. 107, N 6. – P. 2009–2016. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e318187c313>
28. Sevoflurane modulates AQPs (1,5) expression and endoplasmic reticulum stress in mice lung with allergic airway inflammation / C. M. Lv [et al.] // *Biosci. Rep.* – 2019. – Vol. 39, N 11. – Art. BSR20192453. <https://doi.org/10.1042/bsr20193282>
29. Kamondi, A. Mechanisms of antihistamine-induced sedation in the human brain: H1 receptor activation reduces a background leakage potassium current / A. Kamondi, P. B. Reiner // *Neuroscience.* – 1994. – Vol. 59, N 3. – P. 579–588. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90178-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90178-3)
30. Антиоксидантная терапия при лечении перитуморального отека головного мозга // А. Ф. Смяянович [и др.] // *Достижения медицинской науки Беларуси : рец. науч.-практ. ежег. / гл. ред. И. Н. Семененя. – Минск, 2008. – Вып. 13. – С. 92–93.*
31. The effect of ketorolac and triamcinolone acetonide on adipogenic and hepatogenic differentiation through miRNAs 16/15/195: Possible clinical application in regenerative medicine / S. F. Aval [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2018. – Vol. 97. – P. 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.126>
32. Moon, C. Aqp1 expression in erythroleukemia cells: genetic regulation of glucocorticoid and chemical induction / C. Moon, L. S. King, P. Agre // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1997. – Vol. 273, N 5. – P. C1562–C1570. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.5.c1562>
33. Batista de Almeida, A. F. Aquaporins in health and disease / A. F. Batista de Almeida // *Metallo drugs as protein modulators : Ph. D. Thesis / A. F. Batista de Almeida ; University of Groningen. – Groningen, 2016. – P. 59–63.*
34. Gold coordination compounds as chemical probes to unravel aquaporin-7 function / A. Madeira [et al.] // *Chem. Bio. Chem.* – 2014. – Vol. 15, N 10. – P. 1487–1494. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402103>

35. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane / V. Endeward [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, N 12. – P. 1974–1981. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3300com>
36. Boron, W. F. Sharpey-Schafer lecture: gas channels / W. F. Boron // *Exp. Physiol.* – 2010. – Vol. 95, N 12. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.055244>
37. Verkman, A. S. Does aquaporin-1 pass gas? An opposing view / A. S. Verkman // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 542, N 1. – P. 31. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.024398>

References

1. Takata K., Matsuzaki T., Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 2004, vol. 39, no. 1, pp. 1–83. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2004.03.001>
2. Titovets E. Novel computational model of the brain water metabolism: introducing an interdisciplinary approach. *Journal of Computational Systems Biology*, 2018, vol. 2, no. 1, art. 103.
3. Titovets E. Nanofluidic approach to brain water metabolism. *Advances in Nanomedicine and Nanotechnology Research*, 2019, vol. 1, pp. 49–56.
4. Lei Y., Han H., Yuan F., Javeed A., Zhao Y. The brain interstitial system: anatomy, modeling, *in vivo* measurement, and applications. *Progress in Neurobiology*, 2017, vol. 157, pp. 230–246. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.007>
5. Simon M. J., Iliff J. J. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 2016, vol. 1862, no. 3, pp. 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.014>
6. Hasegawa H., Lian S. C., Finkbeiner W. E., Verkman A. S. Extrarenal tissue distribution of CHIP28 water channels by *in situ* hybridization and antibody staining. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 1994, vol. 266, no. 4, pp. C893–C903. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.4.c893>
7. Titovets E. P. *Aquaporins of man and animals: fundamental and clinical aspects*. Minsk, Belorusskaya Nauka Publ., 2007. 239 p. (in Russian).
8. Yool A. J. Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *Neuroscientist*, 2007, vol. 13, no. 5, pp. 470–485. <https://doi.org/10.1177/1073858407303081>
9. Yang B., Ma T., Verkman A. S. Erythrocyte water permeability and renal function in double knockout mice lacking aquaporin-1 and aquaporin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 1, pp. 624–628. <https://doi.org/10.1074/jbc.m008664200>
10. Denker B. M., Smith B. L., Kuhajda F. P., Agre P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, vol. 263, no. 30, pp. 15634–15642. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)37635-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)37635-5)
11. Higaa K., Ochiai H., Fujise H. Molecular cloning and expression of aquaporin 1 (AQP1) in dog kidney and erythroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2000, vol. 1463, no. 2, pp. 374–382. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00218-7](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00218-7)
12. Wintour E. M. Water channels and urea transporters. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 1997, vol. 24, no. 1, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1997.tb01775.x>
13. Abbott N. J., Rönnbäck L., Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006, vol. 7, no. 1, pp. 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
14. Titovets E. P., Smeyanovich A. F. Cerebral edema and the latest trends in the therapy. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2011, no. 1, pp. 84–94 (in Russian).
15. Steiner E., Enzmann G. U., Lin S., Ghavampour S., Hannocks M.-J., Zuber B., Rüegg M. A., Sorokin L., Engelhardt B. Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation. *Glia*, 2012, vol. 60, no. 11, pp. 1646–1669. <https://doi.org/10.1002/glia.22383>
16. Titovets E. P., Parkhach L. P. Novel computational model of the brain water metabolism: introducing an interdisciplinary approach. *Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniya biosistem: Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya; Odinnadtsati s'ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov (17–20 iyunya 2014 goda, Minsk): sbornik statei. Chast' 1* [Molecular, membrane and cellular bases of the functioning of biosystems: International scientific conference; Eleventh congress of the Belarusian public association of photobiologists and biophysicists (June 17–20, 2014, Minsk) : collection of articles. Pt. 1]. Minsk, 2014, pp. 339–341 (in Russian).
17. Soveral G., Casini A. Aquaporin modulators: a patent review (2010–2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2017, vol. 27, no. 1, pp. 49–62. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1236085>
18. Ducza E., Csányi A., Gáspár R. Aquaporins during pregnancy: their function and significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, vol. 18, no. 12, p. 2593. <https://doi.org/10.3390/ijms18122593>
19. Zelinski T., Kaita H., Lewis M., Coghlan G., Philipps S., Belcher E., McAlpine P. J., Coopland G., Wong P. The Colton blood group locus. A linkage analysis. *Transfusion*, 1988, vol. 28, no. 5, pp. 435–438. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1988.28588337331.x>
20. Stoenoiu M. S., Ni J., Verkaeren C., Debaix H., Jonas J.-C., Lameire N., Verbavatz J.-M., Devuyt O. Corticosteroids induce expression of aquaporin-1 and increase transcellular water transport in rat peritoneum. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003, vol. 14, no. 3, pp. 555–565. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000053420.37216.9e>
21. Parkhach L. P., Titovets E. P., Stepanova T. S., Matusevich L. I. Study of the mechanisms of oxygen metabolism of human erythrocytes. *Medline.ru. Rossiiskii biomeditsinskii zhurnal* [Medline.ru. Russian biomedical journal], 2009, vol. 10, pp. 425–441 (in Russian).

22. Ding X.-D., Zheng N.-N., Cao Y.-Y., Zhao G.-Y., Zhao P. Dexmedetomidine preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest. *International Journal of Neuroscience*, 2016, vol. 126, no. 3, pp. 249–256. <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1005291>
23. Küppers E., Gleiser C., Brito V., Wachter B., Pauly T., Hirt B., Grissmer S. AQP4 expression in striatal primary cultures is regulated by dopamine – implications for proliferation of astrocytes. *European Journal of Neuroscience*, 2008, vol. 28, no. 11, pp. 2173–2182. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06531.x>
24. Yool A. J., Morelle J., Cnops Y., Verbavatz J.-M., Campbell M. E., Beckett E. A., Booker G. W., Flynn G., Devuyst O. AqF026 is a pharmacologic agonist of the water channel aquaporin-1. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2013, vol. 24, no. 7, pp. 1045–1052. <https://doi.org/10.1681/asn.2012080869>
25. Voigtlaender J., Heindl B., Becker F. B. Transmembrane water influx via aquaporin-1 is inhibited by barbiturates and propofol in red blood cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2002, vol. 366, no. 3, pp. 209–217. <https://doi.org/10.1007/s00210-002-0580-8>
26. Ding Z., Jiaming Z., Jinyu X., Guangjie S., Guorong H. Propofol administration modulates AQP-4 expression and brain edema after traumatic brain injury. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2013, vol. 67, no. 2, pp. 615–622. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9549-0>
27. Yue-Ying Z., Yun-Ping L., Hui-Fang T., Sheng-Mei Z. Propofol pretreatment attenuates aquaporin-4 over-expression and alleviates cerebral edema after transient focal brain ischemia reperfusion in rats. *Anesthesia and Analgesia*, 2008, vol. 107, no. 6, pp. 2009–2016. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e318187c313>
28. Chang-Ming Lv., Hui-Mei W., Ling W., Guang-Hong X., Zhi-Lai Y., Qi-Ying S. Sevoflurane modulates AQPs (1,5) expression and endoplasmic reticulum stress in mice lung with allergic airway inflammation. *Bioscience Reports*, 2019, vol. 39, no. 11, art. BSR20192453. <https://doi.org/10.1042/bsr20193282>
29. Kamondi A., Reiner P. B. Mechanisms of antihistamine-induced sedation in the human brain: H1 receptor activation reduces a background leakage potassium current. *Neuroscience*, 1994, vol. 59, no. 3, pp. 579–588. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90178-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90178-3)
30. Smeyanovich A. F., Titovets E. P., Lukasheiko Yu. N., Parkhach L. P., Shkut D. N., Bulgak V. V. Antioxidant therapy in treating brain peritumor edema. *Dostizheniya meditsinskoi nauki Belarusi: retsenziruemyi nauchno-prakticheskii ezhegodnik* [Accomplishments of medical science in Belarus: peer-reviewed scientific and practical yearbook]. Minsk, 2008, iss. 13, pp. 92–93 (in Russian).
31. Aval S. F., Zarghami N., Alizadeh E., Mohammadi S. A. The effect of ketorolac and triamcinolone acetonide on adipogenic and hepatogenic differentiation through miRNAs 16/15/195: Possible clinical application in regenerative medicine. *Bio-medicine and Pharmacotherapy*, 2018, vol. 97, pp. 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.126>
32. Moon C., King L. S., Agre P. Aqp1 expression in erythrocytes: genetic regulation of glucocorticoid and chemical induction. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 1997, vol. 273, no. 5, pp. C1562–C1570. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.5.c1562>
33. Batista de Almeida A. F. Aquaporins in health and disease. *Metallo-drugs as protein modulators. Ph.D. Thesis*. Groningen, 2016, pp. 59–63.
34. Madeira A., de Almeida A., de Graaf C., Camps M., Zorzano A., Moura T. F., Casini A., Soveral G. Gold coordination compounds as chemical probes to unravel aquaporin-7 function. *ChemBioChem*, 2014, vol. 15, no. 10, pp. 1487–1494. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402103>
35. Endeward V., Musa-Aziz R., Cooper G. J., Chen L.-M., Pelletier M. F., Virkki L. V., Supuran C. T., King L. S., Boron W. F., Gros G. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB Journal*, 2006, vol. 20, no. 12, pp. 1974–1981. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3300com>
36. Boron W. F. Sharpey-Schafer lecture: gas channels. *Experimental Physiology*, 2010, vol. 95, no. 12, pp. 1107–1130. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.055244>
37. Verkman A. S. Does aquaporin-1 pass gas? An opposing view. *Journal of Physiology*, 2002, vol. 542, no. 1, p. 31. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.024398>

Інфармацыя аб аўтарах

Босякова Екатерина Владимировна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: basiakova.k.v@gmail.com

Титовец Эрнст Петрович – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: eptitovets@gmail.com

Information about the authors

Katerina V. Basiakova – Researcher. Republican Research and Practical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: basiakova.k.v@gmail.com

Ernst P. Titovets – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Republican Research and Practical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: eptitovets@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 577.175.82:[611.814+611.815]:[547.943+547.262]-092.9

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-212-219>

Поступила в редакцию 14.12.2020

Received 14.12.2020

И. М. Величко, С. В. Лелевич, В. В. Лелевич

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

ИЗМЕНЕНИЯ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ГИПОТАЛАМУСЕ И СРЕДНЕМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КОМПЛЕКСНОЙ АЛКОГОЛЬНО-МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Аннотация. В последнее время все чаще стали выявлять случаи отягощения алкогольной патологии приемом наркотиков и наоборот. Имеются данные о важной роли дофаминовой системы в формировании пристрастия к наркотикам и алкоголю. Экспериментально длительное сочетанное действие психоактивных веществ (ПАВ) на нейромедиаторные изменения дофаминергической системы в головном мозге изучено недостаточно и требует более подробного рассмотрения.

Цель исследования – изучить изменения дофаминергической системы в гипоталамусе и среднем мозге крыс при хронической алкогольной интоксикации, а также при комплексном введении морфина и этанола.

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах-самцах. С помощью метода ВЭЖХ в отделах головного мозга были определены уровни дофамина и его метаболитов при хронической алкогольной интоксикации, а также при комплексном введении морфина и этанола с различной продолжительностью (7, 14 и 21 сут).

Хроническая алкогольная интоксикация приводила к признакам ускорения оборота дофамина только в гипоталамусе на 7-е и 14-е сутки и к его накоплению при трехнедельной алкоголизации. В среднем мозге отмечалось снижение концентрации нейромедиатора при введении этанола на протяжении 7 сут. Совместное введение ПАВ сопровождалось несколько иными изменениями: комплексная 7- и 21-дневная алкогольно-морфинная интоксикация сопровождалась накоплением дофамина в гипоталамусе и снижением оборота нейромедиатора в среднем мозге на 14-е и 21-е сутки.

Ключевые слова: этанол, морфина гидрохлорид, средний мозг, гипоталамус, дофамин, норадреналин

Для цитирования: Величко, И. М. Изменения дофаминергической системы в гипоталамусе и среднем мозге крыс при хронической комплексной алкогольно-морфинной интоксикации / И. М. Величко, С. В. Лелевич, В. В. Лелевич // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 212–219. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-212-219>

Ihona M. Vialichko, Sergei V. Lelevich, Vladimir V. Lelevich

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

CHANGES IN THE DOPAMINERGIC SYSTEM IN THE HYPOTHALAMUS AND MIDBRAIN OF RATS AT CHRONIC COMPLEX ALCOHOL-MORPHINE INTOXICATION

Abstract. Recently, there have been more and more indications of alcoholic pathology burdened by drug use and vice versa. It is evident that the dopamine system plays an important role in the development of addiction when using drugs and alcohol. Experimentally, the long-term combined effect of psychoactive substances on neuromediator changes in the dopaminergic system in the brain is poorly understood and requires more detailed consideration.

The aim of the study was to examine the changes in the dopaminergic system in the hypothalamus and midbrain of rats during chronic alcohol intoxication, as well as a complex administration of morphine and ethanol.

The experiments were carried out on white outbred male rats. Using the HPLC method, the levels of dopamine and its metabolites were determined in the regions of the brain during chronic alcohol intoxication, as well as with a combined administration of morphine and ethanol with various durations (7, 14 and 21 days).

Chronic alcohol intoxication led to the signs of acceleration of the dopamine turnover only in the hypothalamus on the 7th and 14th days and its accumulation during three weeks of alcoholization. In the midbrain, a decrease in the concentration of the neurotransmitter was revealed when ethanol was injected for 7 days. Co-administration of surfactants was accompanied by slightly different changes: complex 7- and 21-day alcohol-morphine intoxication is accompanied by the dopamine accumulation in the hypothalamus and the decrease in the neurotransmitter turnover in the midbrain on the 14th and 21st days.

Keywords: ethanol, morphine hydrochloride, midbrain, hypothalamus, dopamine, norepinephrine

For citation: Vialichko I. M., Lelevich S. V., Lelevich V. V. Changes in the dopaminergic system in the hypothalamus and midbrain of rats at chronic complex alcohol-morphine intoxication. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 212–219 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-212-219>

Введение. Хроническая алкогольная и наркотическая интоксикация представляют собой распространенные примеры длительных экзогенных химических воздействий на организм. Психоактивные вещества (ПАВ) действуют на определенные нейромедиаторные системы головного мозга, что вызывает формирование синдрома зависимости [1–4]. Среди структур, особенно чувствительных к токсическому действию этанола и опиоидов, одно из первых мест занимает центральная нервная система (ЦНС) [3–5].

Имеются данные, что нейрохимической основой зависимости от алкоголя и опиоидов является дисфункция дофаминовой нейротрансмиттерной системы мозга, затрагивающая в основном лимбические структуры мозга [1–5]. При хронической алкогольной интоксикации (ХАИ) развивается дефицит катехоламинов, который может принимать угрожающий для жизнедеятельности организма характер [6, 7]. Длительное введение морфина в организм сопровождается менее выраженными изменениями содержания катехоламинов в мозге в сравнении с однократным действием наркотика, что указывает на развитие толерантности к эффектам наркотика [8–11].

ХАИ и хроническая морфиновая интоксикация (ХМИ) являются экспериментальным прообразом болезненного состояния, которое развивается у человека при длительном потреблении ПАВ. Формирование зависимости связывают с повреждающим действием этанола и опиоидов на мембраны клеток мозга [4], с торможением синтеза нуклеиновых кислот и белков [7, 8], а также с изменением функциональной активности нейромедиаторных систем [3, 5, 6, 10, 12].

В клинической практике нередко отмечают случаи совместного или попеременного потребления алкоголя и наркотических веществ [13, 14]. Проблема гетерогенности аддиктивных состояний в настоящее время является одной из главных в клинике наиболее тяжелых наркологических заболеваний. В связи с этим сохраняется острота дискуссии в отношении клинического толкования феномена опиоидной наркомании, осложненной алкоголизмом, и наоборот [13–15].

В экспериментальной практике отсутствуют данные об изменениях показателей дофаминергической системы при совместном длительном введении этанола и морфина, что явилось предпосылкой для выполнения данного исследования.

Цель исследования – изучение показателей дофаминергической системы в среднем мозге и гипоталамусе крыс при хронической алкогольной и комплексной алкогольно-морфиновой интоксикации.

Задача исследования – определить содержание дофамина, его предшественников и метаболитов в среднем мозге, а также в гипоталамусе крыс при ХАИ и комплексном воздействии этанола и морфина.

Объекты и методы исследования. Эксперименты были выполнены на беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, находящихся на стандартном рационе вивария при свободном доступе к воде. Все опыты проводили с учетом «Правил и норм гуманного обращения с биологическими объектами исследований» (протокол № 1 от 30.01.2018 г. УО «ГрГМУ» на заседании комитета по биомедицинской этике). При моделировании ХАИ животным внутрижелудочно вводили 25 %-ный раствор этанола в дозе 3,5 г/кг 2 раза в сутки в течение 7, 14 и 21 сут. Комплексную морфиново-алкогольную интоксикацию (ХМИ + ХАИ) моделировали следующим образом: внутрибрюшинно вводили 1 %-ный раствор морфина гидрохлорида в дозе 10 мг/кг, а через 12 ч внутрижелудочно – этанол в дозе 3,5 г/кг на протяжении 7, 14 и 21 сут. Особи контрольной группы получали эквивалентные количества изотонического раствора хлористого натрия. Декапитацию проводили через 1 ч после последнего введения этанола или физиологического раствора. Были сформированы следующие экспериментальные группы: 1 – контрольная; 2, 4, 6 – ХАИ на протяжении 7, 14 и 21 сут соответственно; 3, 5, 7 – ХМИ + ХАИ на протяжении 7, 14 и 21 сут соответственно.

После декапитации у крыс извлекали головной мозг и на холоде отбирали правый верхний и нижний холмик среднего мозга вместе с покрывкой и черной субстанцией и гипоталамус, которые замораживали в жидком азоте. Затем образцы тканей (20–80 мг) взвешивали и гомогенизировали в 10 объемах 0,2 М HClO_4 , содержащей ванилиновую кислоту (ВА, 10 мкМ), а также 50 мг/л ЭДТА и 50 мг/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ в качестве антиоксиданта, после чего 15 мин центрифугировали при 16 000 г и 4 °С, супернатант немедленно отделяли от осадка.

Уровни биогенных аминов, их предшественников и метаболитов (тирозина, диоксифенилаланина (ДОФА), дофамина, 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (3,4-ДОФУК), гомованилино-

вой кислоты (ГВК), норадреналина (НА)) определяли на колонке Zorbax Eclipse Plus C₁₈, 3,5 мкм, 2,1×150 мм (Agilent); подвижная фаза: 0,1 М NaH₂PO₄, 24 ммоль/л CH₃COOH, pH 3,55, октилсульфонат натрия 110 мг/л, ЭДТА 0,1 мМ, с добавлением 5,2 об. % ацетонитрила. Скорость потока 0,2 мл/мин, температура колонки 27 °С. Детектирование по природной флуоресценции (280/340 нм). Калибровку осуществляли с помощью смеси стандартов, содержащей 10 мкМ определяемых веществ. Для приема и обработки хроматограмм использовали программно-аппаратный комплекс Agilent OpenLab C.01.05 с применением метода внутреннего стандарта [16].

Распределение значений ряда показателей в группах не соответствовало закону нормальному распределению (согласно *W*-критерию Шапиро–Уилка, наличие различий между средними и медианами, а также смещение пика гистограмм). Данные обрабатывали с использованием непараметрических методов с помощью пакета программ Statistica 10,0 (SN: AXAR207F394425FA-Q). Множественные сравнения между независимыми группами были проведены с помощью ANOVA-теста Краскела–Уоллиса, попарные сравнения между независимыми группами – с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы (Me) и рассеяния (25-й, 75-й процентиля). В качестве дополнительного метода статистической обработки был использован пошаговый дискриминантный анализ.

Результаты и их обсуждение. Проведение 7-дневной алкогольной интоксикации (группа 2) сопровождалось достоверно значимым ростом в гипоталамусе крыс содержания тирозина, ДОФА, 3,4-ДОФУК, НА по отношению к контролю (табл. 1). Это является признаком ускорения оборота дофамина при недельном воздействии этанола, что подтверждает факт вовлечения дофаминергической системы в формирование патохимической картины, характерной для алкогольной интоксикации и согласуется с литературными данными [3, 5–10, 12]. Следует отметить, что ДОФА является ключевым субстратом для образования дофамина, НА и обладает важным свойством – в отличие от них, ДОФА проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) из крови к нейронам, что позволяет использовать его для синтеза катехоламинов [4, 7].

Таблица 1. Содержание дофамина и продуктов его метаболизма (нмоль/г) в гипоталамусе крыс при хронической алкогольной и комплексной интоксикации этанолом и морфином

Table 1. The content of dopamine and its metabolic products (nmol/g) in the hypothalamus of the rats in chronic alcoholic and complex intoxication with ethanol and morphine

Параметр	Группа 1 (n = 12)	Группа 2 (n = 8)	Группа 3 (n = 9)	Группа 4 (n = 9)	Группа 5 (n = 9)	Группа 6 (n = 9)	Группа 7 (n = 13)
Тирозин	48,65 (43,86; 53,30)	62,27* (57,32; 66,70)	76,66° (73,00; 78,66)	51,91 (47,83; 58,11)	66,54* (64,86; 76,56)	56,03* (54,48; 57,41)	69,96*# (65,53; 79,88)
ДОФА	0,09 (0,07; 0,10)	0,23* (0,17; 0,29)	0,04*° (0,03; 0,05)	0,32* (0,17; 0,35)	0,12* (0,09; 0,12)	0,10° (0,05; 0,11)	0,08* (0,07; 0,13)
Дофамин	0,83 (0,69; 1,16)	1,15 (0,87; 1,29)	1,39* (1,28; 1,41)	1,18 (1,00; 1,39)	0,81* (0,72; 1,07)	1,31* (1,02; 1,51)	1,17* (1,02; 1,29)
3,4-ДОФУК	1,15 (1,00; 2,10)	2,72* (2,19; 3,55)	1,76° (1,19; 2,18)	2,82* (2,28; 2,99)	1,10° (0,79; 1,55)	1,16° (1,01; 1,20)	1,36# (1,17; 1,68)
ГВК	0,92 (0,74; 1,12)	0,74 (0,49; 1,10)	1,01 (0,72; 1,12)	0,77 (0,69; 0,85)	0,83 (0,72; 1,00)	1,07 (0,90; 1,13)	1,00 (0,71; 1,22)
НА	27,48 (26,15; 30,05)	36,97* (35,76; 38,65)	30,69° (26,98; 34,25)	33,94* (32,72; 36,35)	31,13* (30,11; 31,47)	29,21° (26,59; 33,24)	32,03 (29,56; 34,51)

Примечание. Группы: 1 – контроль; 2 – ХАИ-7; 3 – ХМИ + ХАИ-7; 4 – ХАИ-14; 5 – ХМИ + ХАИ-14; 6 – ХАИ-21; 7 – ХМИ + ХАИ-21. Достоверно значимые отличия ($p < 0,05$): * – с контролем, ° – со 2-й группой; # – с 3-й; ° – с 4-й; ▲ – с 5-й; # – с 6-й группой. То же в табл. 2.

При 7-дневной комплексной интоксикации этанолом и морфином (группа 3) в гипоталамусе отмечался достоверно значимый рост концентраций тирозина, дофамина (на 67 %) и снижение уровня ДОФА (на 43 %) по сравнению с контролем (табл. 1). Содержание тирозина было достоверно значимо выше, а уровни ДОФА, 3,4-ДОФУК и НА были ниже, чем при ХАИ-7 (табл. 1). Данные изменения свидетельствуют о признаках накопления дофамина и снижения процессов его распада при совместном действии ПАВ, чего не наблюдалось при введении этанола с таким же сроком интоксикации.

Увеличение срока алкоголизации до 14 сут (группа 4) сопровождалось статистически значимым повышением в гипоталамусе уровней ДОФА, 3,4-ДОФУК и НА в сравнении с контролем (табл. 1). Показатели дофаминергической системы при двухнедельной алкоголизации не отличались от таковых при ХАИ-7 (группа 2). Таким образом, двухнедельная алкогольная интоксикация вызывает сходие с 7-дневной алкоголизацией изменения показателей дофаминергической системы в гипоталамусе без потенцирования эффекта. Эти сдвиги могут сопровождаться определенными отклонениями функциональной активности ЦНС. Повышенная активность дофаминергической системы сопровождается нарушением обработки сенсорной информации. Кроме того, гиперфункция дофаминергической системы может приводить к чрезмерному усилению сигнал/шум в нейронных цепях, что способствует инициации стереотипных ответов [4, 7].

При комплексной морфиново-алкогольной интоксикации в течение 14 сут (группа 5) значения показателей дофаминергической системы гипоталамуса не изменялись в сравнении с контролем, однако отмечалось повышение уровней тирозина и норадреналина (табл. 1). При этом концентрации ДОФА и 3,4-ДОФУК были достоверно значимо снижены, а содержание тирозина было повышено в сравнении с таковым при 14-дневной алкоголизации (группа 4). Показатели дофаминергической системы в группе 5 были во многом схожи с таковыми в группе 3, при этом концентрация ДОФА была достоверно значимо выше при совместном введении двух ПАВ на протяжении 14 сут (группа 5), а содержание дофамина было ниже, чем при 7-дневной комплексной интоксикацией этанолом и морфином (группа 3).

ХАИ в течение 21 сут (группа 6) сопровождалась повышением содержания дофамина (на 58 %) и тирозина в гипоталамусе по сравнению с контролем, тогда как значения других показателей дофаминергической системы при этом не изменялись (табл. 1).

Анализируя изменения изучаемых показателей в динамике алкогольной интоксикации в гипоталамусе, следует отметить, что содержание ДОФА, 3,4-ДОФУК и НА при 21-дневной алкоголизации, в отличие от 7- и 14-суточной (группы 2 и 4 соответственно), было снижено. Данные изменения могут свидетельствовать об ускорении оборота дофамина на ранних сроках алкоголизации и накоплении самого нейромедиатора при 21-дневной алкогольной интоксикации (табл. 1).

Поочередное введение двух ПАВ на протяжении 21 сут (группа 7) не приводило к достоверно значимым изменениям большинства показателей дофаминергической системы в гипоталамусе в сравнении с контролем, кроме увеличения содержания тирозина и дофамина (табл. 1). Концентрации тирозина и 3,4-ДОФУК в группе 7 превышали таковые при 21-дневном введении только алкоголя (группа 6), а содержание ДОФА было выше, чем в группе 3.

Следовательно, при комплексной интоксикации алкоголем и морфином наиболее выраженные отклонения показателей дофаминергической системы в гипоталамусе отмечались на 7-е и 21-е сутки и выражались в накоплении нейромедиатора. Схожий эффект в данном отделе мозга наблюдался и при 21-дневной алкогольной интоксикации.

В качестве дополнительного метода статистической обработки результатов был использован пошаговый дискриминантный анализ, который подтвердил наличие нарушений функционирования дофаминергической системы в гипоталамусе крыс при воздействии этанола и совместном влиянии морфина и алкоголя в разные сроки интоксикации.

Наибольшую отдаленность по 1-й и 2-й дискриминантным функциям в сравнении с контрольной группой регистрировали при 7-суточном введении ПАВ (рис. 1). По данным дискриминантного анализа, коэффициент лямбда Уилкса равен 0,08 ($F(30,23) = 6,62, p < 0,000$), что свидетельствует о сильной дискриминации. Наиболее информативными показателями по значениям критерия Фишера являются ДОФА, тирозин, 3,4-ДОФУК и дофамин. Наибольший вклад в разделительную способность 1-й дискриминантной функции (кор. 1) вносили переменные дофамин и тирозин, значениями которых в 72 % случаев объяснялись различия между экспериментальными группами (коэффициент канонической корреляции $r = 0,87$). В 11,23 % случаев разделительная способность 2-й дискриминантной функции (кор. 2) обеспечивалась показателями 3,4-ДОФУК, ДОФА и тирозина (коэффициент канонической корреляции $r = 0,65$).

Результаты, отраженные на рис. 1, подтверждают нарушения показателей дофаминергической системы при алкогольной интоксикации, в большей степени они выражены при 7- и 14-суточном воздействии этанола. Совместное введение этанола и морфина на протяжении 7 сут

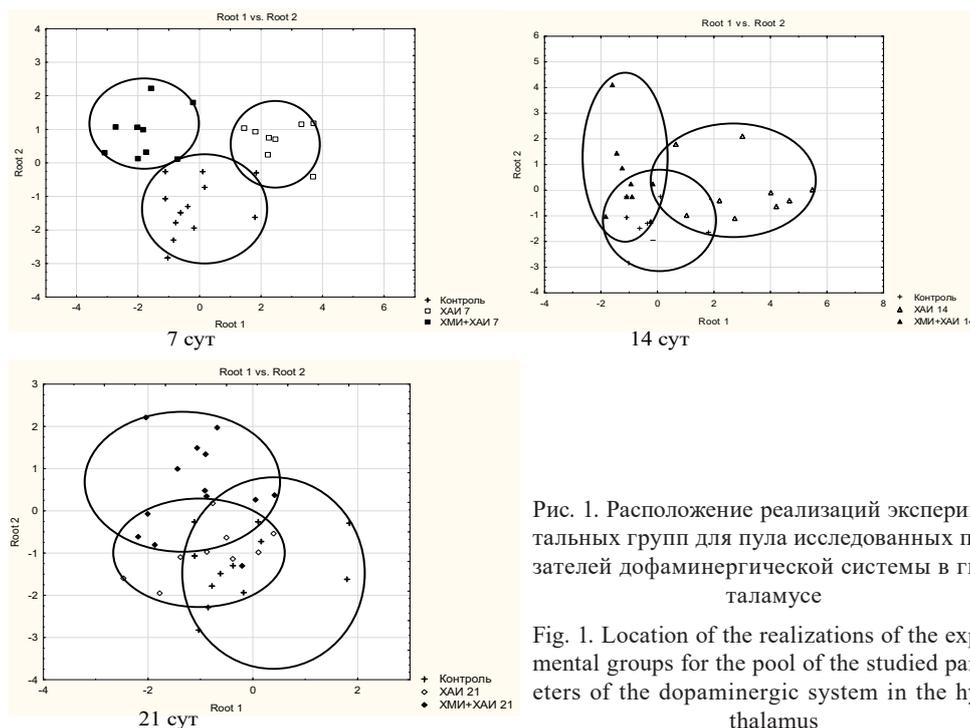


Рис. 1. Расположение реализаций экспериментальных групп для пула исследованных показателей дофаминергической системы в гипоталамусе

Fig. 1. Location of the realizations of the experimental groups for the pool of the studied parameters of the dopaminergic system in the hypothalamus

сопровождалось смещением показателей по отношению к таковым в контрольной группе. Важно отметить, что изменения показателей при 7-суточной хронической алкогольной и комплексной алкогольно-морфиновой интоксикации того же срока были разнонаправленными.

Вполне естественным является предположение, что изменения биохимических процессов при действии алкоголя и опиоида должны затрагивать и средний мозг, содержащий дофаминовые нейроны в вентральной области покрышки и в черной субстанции [4]. Алкогольная интоксикация в течение 7 сут сопровождалась снижением содержания дофамина (на 42 %) и НА, а также повышением уровня 3,4-ДОФУК в среднем мозге по сравнению с контролем, тогда как значения других показателей дофаминергической системы при этом не изменялись (табл. 2).

Комплексное введение ПАВ на протяжении 7 сут (группа 3) сопровождалось значительным снижением (на 43 %) содержания ДОФА в среднем мозге на фоне повышения уровня тирозина по сравнению с таковыми в контрольной группе. При этом концентрации дофамина и тирозина в группе 3 были статистически значимо выше, чем в группе 2 (табл. 2).

Увеличение срока алкоголизации до двух недель (группа 4) не выявило достоверно значимых изменений изучаемых показателей в среднем мозге крыс в сравнении с контролем (табл. 2). Однако концентрация 3,4-ДОФУК при 14-суточной алкоголизации (группа 4) была достоверно значимо ниже, а содержание дофамина выше, чем при 7-дневном введении этанола (группа 2).

Комплексное введение ПАВ на протяжении двух недель (группа 5) привело к снижению концентраций ДОФА, дофамина, 3,4-ДОФУК и повышению уровня тирозина в среднем мозге по сравнению с контролем (табл. 2). Показатели дофаминергической системы при совместном введении этанола и морфина на протяжении 14 сут не отличались от таковых при двухнедельной алкоголизации (группа 4) и комплексной 7-дневной интоксикации (группа 3), отмечалось только снижение концентрации дофамина в группе 5 по сравнению с группами 4 и 3 (табл. 2). Полученные результаты указывают, что при двухнедельной комплексной интоксикации этанолом и морфином отмечается снижение функциональной активности дофаминергической системы в среднем мозге, что подтверждается уменьшением концентрации нейромедиатора и продуктов его метаболизма.

Трехнедельная алкогольная интоксикация (группа 6) приводила к существенному повышению содержания НА (на 85 %) и тирозина в среднем мозге в сравнении с контролем (табл. 2). При этом уровень тирозина, дофамина и НА был выше, а концентрация 3,4-ДОФУК ниже, чем при 7-дневной алкоголизации (группа 2).

Таблица 2. Содержание дофамина и продуктов его метаболизма (нмоль/г) в среднем мозге при хронической алкогольной и комплексной интоксикации этанолом и морфином

Table 2. The content of dopamine and its metabolic products (nmol/g) in the midbrain in chronic alcoholic and complex intoxication with ethanol and morphine

Параметр	Группа 1 (n = 12)	Группа 2 (n = 8)	Группа 3 (n = 9)	Группа 4 (n = 9)	Группа 5 (n = 9)	Группа 6 (n = 9)	Группа 7 (n = 13)
Тирозин	52,40 (45,09; 55,75)	49,46 (40,62; 56,51)	68,37* ^o (58,69; 74,29)	53,31 (43,74; 55,49)	61,71* (55,15; 70,75)	55,84* ^o (53,06; 60,34)	68,78* [#] (55,12; 78,34)
ДОФА	0,07 (0,06; 0,08)	0,06 (0,05; 0,07)	0,04* (0,03; 0,05)	0,056 (0,05; 0,09)	0,05* (0,04; 0,07)	0,05 (0,05; 0,07)	0,07* [▲] (0,06; 0,09)
Дофамин	0,46 (0,36; 0,53)	0,27* (0,22; 0,34)	0,43 ^o (0,29; 0,55)	0,43 ^o (0,42; 0,52)	0,30* [•] (0,26; 0,35)	0,49 ^o (0,40; 0,57)	0,30* [#] (0,27; 0,33)
3,4-ДОФУК	1,37 (0,99; 1,75)	1,93* (1,71; 2,26)	1,19 (0,90; 1,95)	0,94 ^o (0,71; 1,39)	0,78* (0,64; 1,17)	1,16 ^o (1,04; 1,38)	1,06 ^o (0,76; 1,20)
ГВК	0,79 (0,64; 0,90)	1,0 (0,78; 1,13)	0,82 (0,65; 1,18)	0,67 (0,60; 0,74)	0,71 (0,54; 0,83)	0,87 (0,65; 0,98)	0,72 (0,62; 0,78)
НА	8,64 (6,68; 11,46)	6,29* (5,64; 7,01)	7,74 (5,98; 8,28)	6,59 (5,11; 8,07)	6,71 (6,50; 8,67)	14,06* ^o (11,58; 17,06)	9,15 [#] (6,55; 9,78)

Комплексная 21-суточная морфиново-алкогольная интоксикация (группа 7) сопровождалась повышением содержания тирозина и снижением уровня 3,4-ДОФУК в среднем мозге по сравнению с контролем (табл. 2). В то же время концентрация дофамина и НА в данном отделе мозга при комплексной трехнедельной интоксикации была статистически значимо ниже, а тирозина выше, чем при алкогольной интоксикации такой же длительности (группа 6). При этом уровень ДОФА в группе 7 превышал таковой в группах 3 и 5, а концентрация дофамина была ниже, чем при 7-суточной комплексной интоксикации (группа 3).

Результаты пошагового дискриминантного анализа подтверждают изменения показателей дофаминергической системы в среднем мозге при хронической алкогольной интоксикации и комплексном введении алкоголя и морфина (рис. 2). Наиболее информативными показателями при этом были НА, тирозин, ДОФА и дофамин (коэффициент лямбда Уилкса равен 0,13F

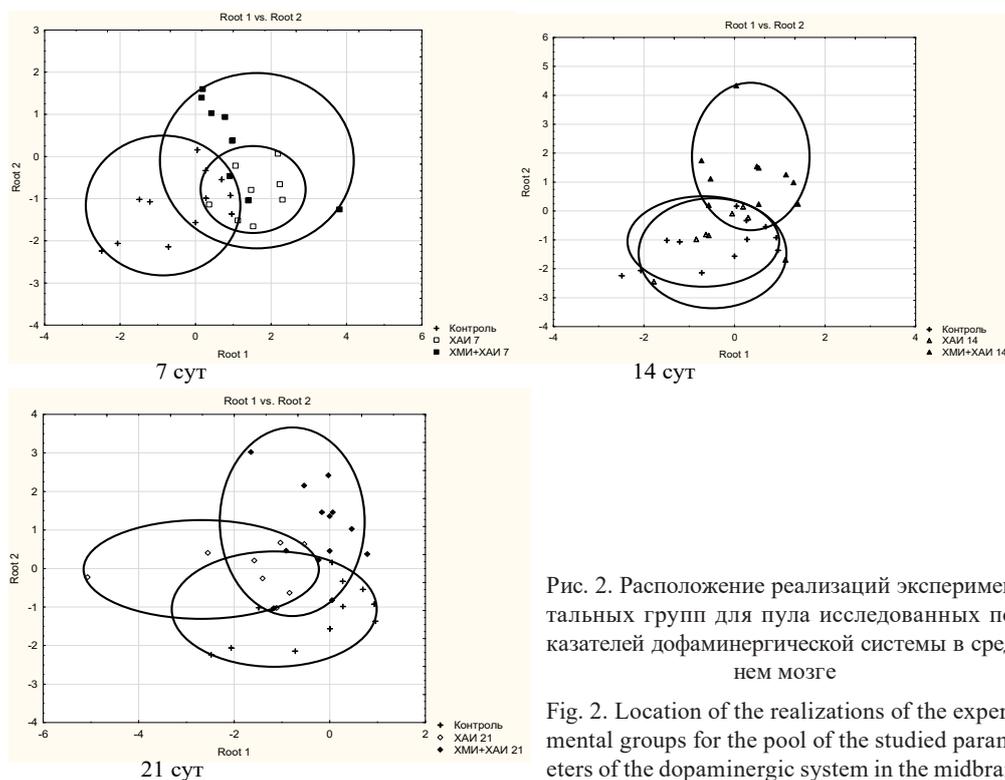


Рис. 2. Расположение реализаций экспериментальных групп для пула исследованных показателей дофаминергической системы в среднем мозге

Fig. 2. Location of the realizations of the experimental groups for the pool of the studied parameters of the dopaminergic system in the midbrain

(36,24) = 4,1, $p < 0,000$, что свидетельствует о слабой дискриминации в данном отделе мозга). В разделительную способность 1-й дискриминантной функции наибольший вклад вносили ДОФА и дофамин, чем в 35 % случаев объяснялись различия между экспериментальными группами (коэффициент канонической корреляции $r = 0,7$). В 33 % случаев разделительная способность 2-й дискриминантной функции (кор. 2) обеспечивалась показателями ДОФА, дофамина и ГВК (коэффициент канонической корреляции $r = 0,69$).

Выводы

1. Хроническая алкогольная интоксикация сопровождалась ускорением оборота дофамина в гипоталамусе через 7 и 14 сут и его накоплением в данном отделе мозга спустя 21 сут. При этом уровень дофамина в среднем мозге снижался при 7-дневной алкоголизации.

2. При комплексной 7- и 21-дневной морфиново-алкогольной интоксикации в гипоталамусе наблюдалось накопление дофамина.

3. В среднем мозге попеременное введение морфина и этанола сопровождалось уменьшением уровня ДОФА через 7 сут и снижением оборота дофамина на 14-е и 21-е сутки интоксикации, что подтверждается падением уровня нейромедиатора и продуктов его метаболизма.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Ethanol and acetaldehyde action on central dopamine systems: mechanisms, modulation, and relationship to stress / M. Melis [et al.] // *Alcohol*. – 2009. – Vol. 43, N 7. – P. 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.05.004>
2. Анохина, И. П. Структура и функция $\alpha 2$ -адренергических рецепторов и их роль в развитии алкогольной и наркотической зависимости / И. П. Анохина, Н. Л. Векшина, В. А. Томилин // *Наркология*. – 2008. – № 1. – С. 22–28.
3. Пивоварчик, М. В. Участие опиоидной и дофаминовой систем мозга в реализации аддиктивных свойств этанола / М. В. Пивоварчик // *Журн. Гродн. гос. мед. ун-та*. – 2003. – № 4. – С. 3–6.
4. Молекулярные и клеточные механизмы опиоидной наркомании / В. В. Внуков [и др.] // *Журн. фонд. медицины и биологии*. – 2013. – № 3. – С. 4–12.
5. Лелевич, С. В. Нейрохимические аспекты алкогольной интоксикации / С. В. Лелевич, И. М. Величко, В. В. Лелевич // *Журн. Гродн. гос. мед. ун-та*. – 2017. – Т. 15, № 4. – С. 375–380.
6. Николишин, А. Е. Алкогольная зависимость и депрессия: дофаминовая нейромедиация как ключ к изучению коморбидности / А. Е. Николишин, А. Г. Гофман, А. О. Кибитов // *Наркология*. – 2016. – № 8. – С. 80–87.
7. Головкин, А. И. Нейрохимические парадоксы в современной наркологии / А. И. Головкин, Г. А. Софронов // *Нейрохимия*. – 2011. – Т. 28, № 1. – С. 5–18.
8. Центральные нейрохимические эффекты острого и хронического воздействия этанола. Механизмы толерантности и зависимости (обзор литературы) / В. Б. Долго-Сабуров [и др.] // *Medline.ru. Рос. биомед. журн.* – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 1423–1436.
9. Effects of sequential ethanol exposure and repeated high-dose methamphetamine on striatal and hippocampal dopamine, serotonin and glutamate tissue content in Wistar rats / A. H. Almalki [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2018. – Vol. 665. – P. 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.043>
10. Лелевич, С. В. Нейромедиаторные системы ствола и мозжечка головного мозга при экспериментальной хронической алкогольной и морфиновой интоксикации / С. В. Лелевич, Е. В. Барковский // *Журн. Гродн. гос. мед. ун-та*. – 2011. – № 4. – С. 58–61.
11. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats / Z. Zhang [et al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2007. – Vol. 31, N 11. – P. 1811–1819. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00483.x>
12. Лелевич, С. В. Особенности нейромедиации в головном мозге крыс при хронической алкогольной интоксикации / С. В. Лелевич, В. В. Лелевич, Е. М. Дорошенко // *Вопр. наркологии*. – 2010. – № 3. – С. 56–66.
13. Ялтонский, В. М. Сочетанное употребление наркотиков и других психоактивных веществ подростками как актуальная проблема наркологии / В. М. Ялтонский, Н. А. Сирота, А. В. Ялтонская // *Вопр. наркологии*. – 2017. – № 7. – С. 82–93.
14. Бохан, Н. А. Коморбидность опиоидной наркомании и алкоголизма у больных молодого возраста: клинические варианты двойного диагноза / Н. А. Бохан, Л. Н. Благов, Д. И. Кургак // *Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 2012. – Т. 112, № 5, вып. 2. – С. 17–23.
15. Шарбичев, Ю. Т. Коморбидность – актуальная научная и научно-практическая проблема медицины XXI века / Ю. Т. Шарбичев, В. В. Антипов, С. И. Антипова // *Мед. новости*. – 2014. – № 8. – С. 6–11.
16. 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. 551–556.

References

1. Melis M., Diana M., Enrico P., Marinelli M., Brodie M. S. Ethanol and acetaldehyde action on central dopamine systems: mechanisms, modulation, and relationship to stress. *Alcohol*, 2009, vol. 43, no. 7, pp. 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.05.004>
2. Anokhina I. P., Vekshina N. L., Tomilin V. A. Structure and function of $\alpha 2$ -adrenergic receptors and their role in the development of alcohol and drug addiction. *Narkologiya* [Narcology], 2008, no. 1, pp. 22–28 (in Russian).
3. Pivovarchik M. V. Participation of the opioid and dopamine systems of the brain in the realization of the addictive properties of ethanol. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of Grodno State Medical University], 2003, no. 4, pp. 3–6 (in Russian).
4. Vnukov V. V., Chernikova I. V., Milyutina N. P., Ananyan A. A., Panchenko L. F. Molecular and cellular mechanisms of opium addiction. *Zhurnal fundamental'noi meditsiny i biologii* [Journal of fundamental medicine and biology], 2013, no. 3, pp. 4–12 (in Russian).
5. Lelevich S. V., Velichko I. M., Lelevich V. V. Neurochemical aspects of alcohol intoxication. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of Grodno State Medical University], 2017, vol. 15, no. 4, pp. 375–380 (in Russian).
6. Nikolishin A. E., Gofman A. G., Kibitov A. O. Alcohol dependence and depression: dopamine neuromediation as a key to studying comorbidity. *Narkologiya* [Narcology], 2016, no. 8, pp. 80–87 (in Russian).
7. Golovko A. I., Sofronov G. A. Neurochemical paradoxes in modern narcology. *Neirokhimiya* [Neurochemistry], 2011, vol. 28, no. 1, pp. 5–18 (in Russian).
8. Dolgo-Saburov V. B., Petrov A. N., Lisitskii D. S., Belyaev V. A. Central neurochemical effects of acute and chronic exposure to ethanol. Mechanisms of tolerance and addiction (literature review). *Medline.ru. Rossiiskii biomeditsinskii zhurnal* [Medline.ru. Russian biomedical journal], 2011. vol. 12, no. 4, pp. 1423–1436 (in Russian).
9. Almalki A. H., Das S. C., Alshehri F. S., Althobaiti Y. S., Sari Y. Effects of sequential ethanol exposure and repeated high-dose methamphetamine on striatal and hippocampal dopamine, serotonin and glutamate tissue content in Wistar rats. *Neuroscience Letters*, 2018, vol. 665, pp. 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.043>
10. Lelevich S. V., Barkovskii E. V. Neurotransmitter systems of the brain stem and cerebellum in experimental chronic alcohol and morphine intoxication. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of Grodno State Medical University], 2011, no. 4, pp. 58–61 (in Russian).
11. Zhang Z., Morse A. C., Koob G. F., Schulteis G. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2007, vol. 31, no. 11, pp. 1811–1819. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00483.x>
12. Lelevich S. V., Lelevich V. V., Doroshenko E. M. Features of neuromediation in the brain of rats with chronic alcohol intoxication. *Voprosy narkologii* [Narcology questions], 2010, no. 3, pp. 56–66 (in Russian).
13. Yaltonskii V. M., Sirota N. A., Yaltonskaya A. V. Combined use of drugs and other psychoactive substances by adolescents as an urgent problem of narcology. *Voprosy narkologii* [Narcology questions], 2017, no. 7, pp. 82–93 (in Russian).
14. Bokhan N. A., Blagov L. N., Kurgak D. I. Comorbidity of opioid drug addiction and alcoholism in young patients: clinical variants of dual diagnosis. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S. S. Korsakova* [Journal of neurology and psychiatry named after S. S. Korsakov], 2012, vol. 112, no. 5, iss. 2, pp. 17–23 (in Russian).
15. Sharabchiev Yu. T., Antipov V. V., Antipova S. I. Comorbidity is an urgent scientific and scientific-practical problem of medicine of the XXI century. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2014, no. 8, pp. 6–11 (in Russian).
16. Doroshenko E. M., Snezhitskii V. A., Lelevich V. V. The structure of the pool of free amino acids and their derivatives in blood plasma in patients with ischemic heart disease and manifestation of chronic heart failure. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of Grodno State Medical University], 2017, vol. 15, no. 5, pp. 551–556 (in Russian).

Информация об авторах

Величко Илона Михайловна – ассистент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: velichko.ilona@mail.ru

Лелевич Сергей Владимирович – д-р мед. наук, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: slelevich@yandex.ru

Лелевич Владимир Валерьянович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vlelevich@yandex.ru

Information about the authors

Ilona M. Vialichka – Assistant. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: velichko.ilona@mail.ru

Sergei V. Lelevich – D. Sc. (Med.), Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: slelevich@yandex.ru

Vladimir V. Lelevich – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vlelevich@yandex.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК [616.276+615.212]:547.466

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-220-227>

Поступила в редакцию 07.07.2020

Received 07.07.2020

А. В. Волчек, Б. В. Дубовик

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОМБИНАЦИИ МЕЛОКСИКАМА И N-АЦЕТИЛ-L-ПРОЛИНА

Аннотация. На модели каррагенинового отека лапы у мышей изучены противовоспалительные свойства комбинации мелоксикама и атипичного противовоспалительного средства N-ацетил-L-пролина (Гроцепрол®) при внутривентральном введении. Рассчитанные методом регрессионного анализа среднеэффективные дозы N-ацетил-L-пролина и мелоксикама составили 414 и 2,85 мг/кг соответственно. При сочетанном применении этих соединений в соотношении 40:1 их активность существенно возросла, ED₅₀ мелоксикама снизилась до 1 мг/кг, а аналогичный показатель N-ацетил-L-пролина составил 43 мг/кг. Такая же тенденция наблюдалась и при другом массовом соотношении данных компонентов – 20:1. Анализ фармакодинамики комбинации препаратов по методике T. Chou показал аддитивный тип их взаимодействия, характерный для соединений с различными молекулярными мишенями. Установлено, что комбинаторные сочетания N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в массовых соотношениях 40:1 и 20:1 демонстрируют синергизм, что позволяет снижать дозы компонентов в 2,7–9,6 раза.

Взаимное усиление противовоспалительной эффективности НПВС N-ацетил-L-пролина и мелоксикама при их сочетанном применении по сравнению с их использованием индивидуально позволяет уменьшить дозу каждого из компонентов композиции, что минимизирует побочные эффекты и токсические риски и обосновывает приемлемость практического применения этой синергичной комбинации.

Ключевые слова: N-ацетил-L-пролин, мелоксикам, нестероидное противовоспалительное средство, каррагениновое воспаление

Для цитирования: Волчек, А. В. Противовоспалительные свойства комбинации мелоксикама и N-ацетил-L-пролина / А. В. Волчек, Б. В. Дубовик // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 220–227. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-220-227>

Aliaksandr U. Vauchok, Barys V. Dubovik

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF THE COMBINATION OF MELOXICAM AND N-ACETYL-L-PROLINE

Abstract. The anti-inflammatory properties of the combination of meloxicam and atypical NSAID N-acetyl-L-proline (Groceprol®) after intragastric administration in a model of carrageenan paw edema in mice were studied. The average effective dose of N-acetyl-L-proline calculated by the regression analysis method in this model was 414 mg/kg, and the average effective dose of meloxicam was 2.85 mg/kg. In the combination in a ratio of 40:1, the activity of the compounds increases significantly, the ED₅₀ of meloxicam decreases to 1 mg/kg, a similar value of N-acetyl-L-proline becomes 43 mg/kg. The same trend was also observed with another mass ratio of components of 20:1. The analysis of the pharmacodynamics of the combination of drugs according to the T. Chou method showed an additive type of interaction, typical for compounds with different mechanisms of primary action. It was established that a combination of N-acetyl-L-proline and meloxicam in the weight ratios of 40:1 and 20:1 demonstrate synergism, allowing to reduce the dose of the components in 2.7–9.6 times as compared with the effect of the drugs individually.

The results of the study are the experimental justification for the use of anti-inflammatory synergistic combination of N-acetyl-L-proline and meloxicam.

Keywords: N-acetyl-L-proline, meloxicam, non-steroidal anti-inflammatory drug, carrageenan induced paw edema

For citation: Vauchok A. U., Dubovik B. V. Anti-inflammatory properties of the combination of meloxicam and N-acetyl-L-proline. *Vesti Natsyynal'nei akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 220–227 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-220-227>

Введение. Противовоспалительные средства широко применяются в современной медицине для лечения воспалительного синдрома при таких патологических состояниях, как системные заболевания соединительной ткани, болезни костно-суставной и мышечной систем, травмы и локальные повреждения тканей. Стратегия лечения воспаления включает подавление воспалительного отека, анальгезию, а также модификацию отдаленных последствий.

В качестве агентов, уменьшающих отек тканей и боль при воспалении, используют преимущественно две группы лекарств: нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) и глюкокортикостероиды (ГКС).

Эффективность ГКС чрезвычайно высока, но их широкое применение ограничено вследствие риска развития таких тяжелых и инвалидизирующих побочных эффектов, как угрожающее жизни угнетение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, артериальная гипертензия, стероидные гастропатии и миопатии, психозы, остеопороз и асептический некроз кости. Следует отметить, что ГКС при воспалении оказывают лишь паллиативный эффект, обусловленный их противовоспалительным и иммуносупрессивным действием, при этом их применение не останавливает, а усугубляет деструкцию соединительной ткани, замедляя заживление ран.

Наибольшее распространение получили НПВС. Эти лекарственные средства назначают для облегчения симптомов при остеоартрозе, ревматоидном артрите, воспалительных артропатиях, а также при легких и среднетяжелых травмах опорно-двигательного аппарата в спортивной медицине. Их противовоспалительное действие обусловлено ингибированием синтеза инфламмагенных простагландинов (ПГ). Однако изучение роли различных медиаторов при воспалении показало, что в зависимости от причины, вызвавшей патологический процесс, вклад ПГ при острой фазе воспалительного отека колеблется от 20 до 70 % [1]. Соответственно, в зависимости от заболевания, при котором используются НПВС, их противоотечная эффективность различна, а полная ингибция отека с помощью одного препарата, влияющего на ПГ, практически не достижима.

Таким образом, для ингибиторов циклооксигеназы (ЦОГ) характерен насыщающий тип зависимости доза–эффект, в результате чего их противовоспалительный эффект ограничен определенным пределом, выше которого он не может возрасти даже при увеличении дозы препарата. Этот предел нельзя повысить и путем совместного применения нескольких НПВС – ингибиторов ЦОГ. Поэтому определенный интерес представляет поиск средств, которые влияют на другие медиаторы острой фазы воспаления и могут быть использованы как индивидуально, так и в комбинации с НПВС.

Важной стратегической целью при лечении воспалительных заболеваний является модификация исхода болезни. ГКС и НПВС, обладая противовоспалительной активностью, не останавливают деградацию соединительной ткани при воспалении, а многие из них, например ГКС, индометацин, даже усиливают ее. В связи с этим для управления дегенеративным процессом представляется перспективным использование индукторов репарации, таких как производные L-пролина. Имеются сведения о их значительном репаративном потенциале [2–4], а также о их способности подавлять клеточную инфильтрацию и продукцию активных форм кислорода макрофагами при воспалении, ингибировать инфламмагенную деструкцию тканей [5–7]. При этом производные L-пролина лишены характерных для НПВС, ингибиторов ЦОГ, жаропонижающих и гастропротективных свойств [8, 9]. По нашим данным, в ряду гидроксид- и аминопроизводных L-пролина наибольшей противовоспалительной активностью обладает N-ацетил-L-пролин [10].

Цель работы – изучение противовоспалительных свойств комбинации N-ацетил-L-пролина и малотоксичного нестероидного противовоспалительного средства мелоксикама.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено в условиях экспериментальной лаборатории научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского университета в соответствии с нормами биомедицинской этики и правилами гуманного обращения с животными, с соблюдением требований Европейской конвенции 86/609 ЕЕС. Противовоспалительную активность мелоксикама, N-ацетил-L-пролина и их комбинаций исследовали на 100 мышах-самцах линии C57Bl/6 массой 30–36 г на модели острого каррагининового отека, воспроизводящего экссудативно-клеточную фазу воспалительной реакции. Лямбда-каррагинин – ионогенный полисахарид, модельный флогогенный агент, широко используемый в экспериментальной медицине для скрининга и изучения противовоспалительных средств. Субплантарное введение каррагинина вызывает у мышей выраженную воспалительную реакцию, характеризующуюся трехфазной динамикой течения. Первая фаза (нарастания отека) занимает около 2 ч после инъекции флогогена, вторая (плато) – примерно 2, третья (регрессии отека) – 8 ч, завершаясь обычно восстановлением исходных параметров конечности. Молекулярный механизм воспаления после введения в ткани геля каррагинина включает: индукцию ИЛ-8; активацию NFκB

посредством толл-подобных рецепторов типов 4 и 6 и активных форм кислорода; наработку ПГ Е2. Цитокины ИЛ-6 и ФНО- α не принимают участия в инициации каррагенинового воспаления [11]. В работе использовали субстанцию N-ацетил-L-пролина, предоставленную Институтом физико-органической химии НАН Беларуси, мелоксикам производства «Берингер Ингельхайм» (Испания) и ирритант лямбда-каррагенин, приобретенный в Sigma Aldrich (США).

Препараты в виде суспензий вводили с помощью жесткого зонда интрагастрально в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела животного. В качестве суспензионной среды использовали 1 %-ный крахмальный гель, контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя. Опытные и контрольные группы животных (по 10 мышей) формировали методом рандомизации по массе тела в качестве основного признака. Острое воспаление вызывали путем введения 1 %-ного водного раствора лямбда-каррагенина по 0,03 мл под плантарный апоневроз задней правой лапы. Воспалительную реакцию оценивали по величине отека стопы через 1, 2, 3, 4, 5 и 24 ч после инъекции флогогена. Толщину стопы измеряли с помощью микрометрического устройства с точностью до 0,01 мм в условиях постоянного давления. Величину отека выражали в миллиметрах.

За 30 мин до индукции воспаления животным интрагастрально вводили мелоксикам в дозах 2,5 и 5 мг/кг и N-ацетил-L-пролин в дозах 100, 200 и 400 мг/кг на 1 %-ном крахмальном геле в объеме 0,1 мл/10 г массы тела. Комбинаторные сочетания N-ацетил-L-пролина и мелоксикама исследовали в соотношениях 40:1 и 20:1 (уровни пороговых и субпороговых противовоспалительных доз компонентов – 50 + 1,25 и 100 + 2,5 мг/кг; 25 + 1,25 и 50 + 2,5 мг/кг соответственно). Противовоспалительный эффект соединений оценивали по индексам ингибирования (I) различных фаз воспалительной реакции в сравнении с плацебо и рассчитывали по формуле $I = 100(S_d - S_p)/S_p$, где S_d и S_p – средние значения площадей под кинетическими кривыми отека лапы соответственно для групп, получавших испытуемые препараты или плацебо. Значения S_d и S_p определяли путем суммирования площадей трапеций под кривыми в координатах время–эффект.

Полученные данные обрабатывали с помощью параметрических и непараметрических критериев вариационной статистики. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Анализ фармакодинамического взаимодействия препаратов выполнен по методике Т. Chou [12] посредством специально разработанного интерактивного алгоритма с использованием вычислительных возможностей компьютерной программы Microsoft Excel. Методом регрессионного анализа определяли эффективные дозы (ED16–ED84) индивидуальных субстанций и их комбинаторного сочетания. Уравнение регрессии считали качественным при ошибке аппроксимации данных менее 15 %.

Результат взаимодействия оценивали по значению комбинаторного индекса (CI):

$$CI = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j},$$

где $(D)_j$ – доза агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении; $(D_x)_j$ – доза агента, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении.

Значения CI трактовали в соответствии со шкалой Chou–Talalay: $CI < 0,10$ – очень сильный синергизм; $CI = 0,10–0,30$ – сильный синергизм; $CI = 0,30–0,70$ – синергизм; $CI = 0,70–0,85$ – умеренный синергизм; $CI = 0,85–0,90$ – слабый синергизм; $CI = 0,90–1,10$ – аддитивный эффект; $CI = 1,10–1,20$ – слабый антагонизм; $CI = 1,20–1,45$ – умеренный антагонизм; $CI = 1,45–3,30$ – антагонизм; $CI = 3,30–10,0$ – сильный антагонизм; $CI > 10$ – очень сильный антагонизм.

Индекс снижения дозы (DRI) компонентов комбинации рассчитывали по формуле $DRI_j = (D_x)_j/(D)_j$.

Значение DRI показывает, во сколько раз можно снизить дозу каждого компонента в синергичной комбинации для достижения эффекта, сопоставимого с индивидуальным действием компонента. Результаты представляли графически в виде рассчитанной с помощью регрессионного анализа зависимости доза–эффект индивидуальных субстанций и их комбинации, распределений CI –эффект и DRI –эффект.

Результаты и их обсуждение. Действие мелоксикама, N-ацетил-L-пролина и их комбинации на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей представлено в табл. 1, 2, на рис. 1–3.

Таблица 1. Влияние мелоксикама, N-ацетил-L-пролина и их комбинаций в соотношениях 20:1 и 40:1 на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей ($n = 10$) ($M \pm m$)Table 1. The effect of meloxicam, N-acetyl-L-proline and their combinations in ratios 20:1 and 40:1 on the dynamics of acute carrageenan inflammation of the mice paw ($n = 10$) ($M \pm m$)

Субстанция	Дозы и их соотношение, мг/кг	Увеличение отека стопы, мм					
		через 1 ч	через 2 ч	через 3 ч	через 4 ч	через 5 ч	через 24 ч
Плацебо	–	1,21 ± 0,08	1,22 ± 0,06	1,39 ± 0,05	1,30 ± 0,05	0,93 ± 0,06	0,60 ± 0,07
Мелоксикам	2,5	0,61 ± 0,06*	0,93 ± 0,10*	0,92 ± 0,08*	0,93 ± 0,09*	0,81 ± 0,10	0,55 ± 0,07
	5	0,61 ± 0,05*	0,57 ± 0,05*	0,57 ± 0,06*	0,51 ± 0,04*	0,43 ± 0,03*	0,34 ± 0,02*
N-ацетил-L-пролин	100	0,84 ± 0,04	1,15 ± 0,06	1,19 ± 0,07	1,11 ± 0,07	0,92 ± 0,06	0,51 ± 0,07
	200	0,66 ± 0,09*	0,89 ± 0,10*	0,97 ± 0,10*	0,92 ± 0,09*	0,92 ± 0,09	0,29 ± 0,07
	400	0,56 ± 0,07*	0,75 ± 0,07*	0,99 ± 0,06*	0,83 ± 0,08*	0,65 ± 0,07*	0,53 ± 0,07
Комбинация N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в соотношении 20:1	25:1,25	0,76 ± 0,06*	0,72 ± 0,05*	0,79 ± 0,07*	0,77 ± 0,07*	0,57 ± 0,05*	0,41 ± 0,02*
	50:2,5	0,76 ± 0,05*	0,85 ± 0,06*	0,78 ± 0,04*	0,66 ± 0,03*	0,55 ± 0,02*	0,37 ± 0,02*
Комбинация N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в соотношении 40:1	50:1,5	0,81 ± 0,04*	0,83 ± 0,04*	0,75 ± 0,04*	0,69 ± 0,06*	0,49 ± 0,03*	0,29 ± 0,02*
	100:2,5	0,57 ± 0,05*	0,63 ± 0,03*	0,64 ± 0,04*	0,58 ± 0,05*	0,39 ± 0,03*	0,28 ± 0,02*

Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с плацебо.

Таблица 2. Индексы ингибирования (%) в различные фазы каррагенинового воспаления лапы у мышей ($n = 10$) после введения N-ацетил-L-пролина, мелоксикама и их комбинаций в соотношениях 20:1 и 40:1 ($M \pm m$)Table 2. Inhibition indices (%) of various phases of paw carrageenan inflammation in mice ($n = 10$) after administration of N-acetyl-L-proline, meloxicam and their combinations in ratios 20:1 and 40:1 ($M \pm m$)

Субстанция	Дозы и их соотношение, мг/кг	Фазы воспалительного отека		
		0–2 ч	2–5 ч	0–5 ч
Мелоксикам	2,5	41,1 ± 8,05*†	28,1 ± 7,02*†	32,4 ± 6,71*†
	5	50,7 ± 6,81*†	58,3 ± 4,34*†‡	55,8 ± 4,51*†‡
N-ацетил-L-пролин	400	48,5 ± 7,79*†	33,2 ± 5,64*†	38,2 ± 5,73*†
	200	39,6 ± 7,30*†	26,2 ± 7,16*†	30,6 ± 6,34*†
	100	22,4 ± 6,04*	11,7 ± 4,97	15,2 ± 4,71*
Комбинация N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в соотношении 20:1	25:1,25	39,0 ± 6,71*†	41,9 ± 5,36*†	40,9 ± 5,32*†
	50:2,5	35,1 ± 6,35*†	43,3 ± 3,40*†	40,6 ± 3,67*†
Комбинация N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в соотношении 40:1	50:1,5	33,0 ± 5,79*	44,5 ± 4,20*†‡	40,8 ± 3,88*†
	100:2,5	51,5 ± 6,33*†‡	54,2 ± 3,82*†‡	53,3 ± 3,70*†‡

Примечание. Достоверность различий ($p < 0,05$): * – в сравнении с плацебо; † – в сравнении с N-ацетил-L-пролином в дозе 100 мг/кг; ‡ – в сравнении с мелоксикамом в дозе 2,5 мг/кг.

Мелоксикам при индивидуальном применении в дозах 2,5 и 5 мг/кг в различные фазы острой воспалительной реакции угнетал отечную реакцию на флоген на 40–50 %, а его расчетная ED₅₀ по противовоспалительному эффекту составила 2,85 мг/кг. Линии регрессии доза–эффект мелоксикама в лог-нормальных координатах представлены на рис. 4.

N-ацетил-L-пролин, испытанный на каррагениновой модели воспаления лапы у мышей в диапазоне доз от 100 до 400 мг/кг, оказывал дозозависимое противовоспалительное действие, которое при дозах 200 и 400 мг/кг приближалось к эффекту мелоксикама в дозе 2,5 мг/кг. Регрессионный анализ показал дозозависимый характер изменения величины воспалительного отека у мышей, получавших N-ацетил-L-пролин (рис. 4). При высоком уровне качества аппроксимации данных (точность более 95 %) расчетная ED₅₀ N-ацетил-L-пролина по противовоспалительному эффекту составила 414 мг/кг.

Комбинации N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в массовом соотношении 40:1 (50 мг/кг N-ацетил-L-пролина + 1,25 мг/кг мелоксикама и 100 мг/кг N-ацетил-L-пролина + 2,5 мг/кг мелоксикама) статистически достоверно в сравнении с группой контроля подавляли острую фазу каррагенинового отека лапы, индексы ингибирования составили соответственно 41 ± 2,6 и 53 ± 2,1 %.

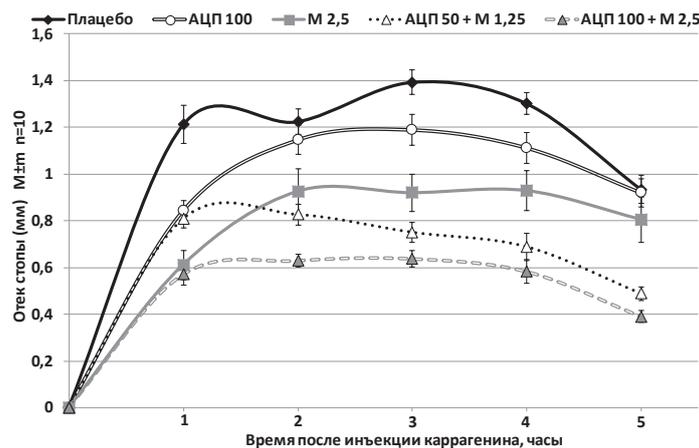


Рис. 1. Влияние мелоксикама (М), N-ацетил-L-пролина (АЦП) и их комбинации в соотношении 40:1 на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей (по данным табл. 1)

Fig. 1. The effect of meloxicam, N-acetyl-L-proline and their combination in a ratio of 40:1 on the dynamics of acute carrageenan inflammation of the mice paws (according to Tab. 1)

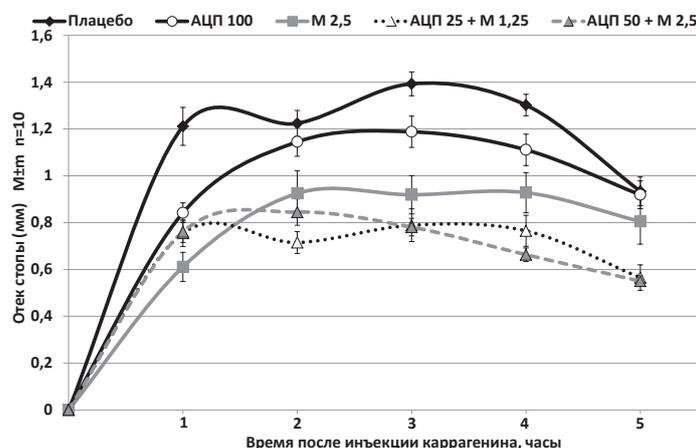


Рис. 2. Влияние мелоксикама (М), N-ацетил-L-пролина (АЦП) и их комбинации в соотношении 20:1 на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей (по данным табл. 1)

Fig. 2. The effect of meloxicam, N-acetyl-L-proline and their combination in a ratio of 20:1 on the dynamics of acute carrageenan inflammation of the mice paws (according to Tab. 1)

Результат действия комбинаций значительно превышал индивидуальные эффекты компонентов в аналогичных дозах ($p < 0,05$ по критерию Ньюмана–Кеулса). Кривые регрессии противовоспалительного эффекта N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в составе комбинаторного сочетания в соотношении 40:1, полученные путем аппроксимации данных, представлены на рис. 4.

Анализ результатов взаимодействия N-ацетил-L-пролина и мелоксикама по T. Chou показал, что в диапазоне ED16–ED84 индекс снижения дозы (DRI) мелоксикама составил 4,5–1,1 (рис. 5), а ED50 препарата в комбинации в 2,7 раза меньше, чем при индивидуальном применении. Среднеэффективная противовоспалительная доза N-ацетил-L-пролина в комбинаторном сочетании с мелоксикамом может быть снижена примерно в 9,6 раза по сравнению с индивидуальным действием препарата. В диапазоне эффективных доз ED16–ED84 DRI N-ацетил-L-пролина снижался с 12,4 до 7,4.

Комбинаторный индекс (CI) сочетания препаратов представлен на рис. 5. Во всем диапазоне регрессионных кривых доза–эффект комбинация демонстрирует однонаправленный характер взаимодействия. Показатель CI сочетания N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в соотношении 40:1 находится в диапазоне 0,24–1,04, что в соответствии с принципами комбинаторной фармакологии [12] может быть охарактеризовано как синергизм от сильного к умеренному. Среднеэффективные дозы комбинации проявляют синергичное взаимодействие (CI составляет 0,48).

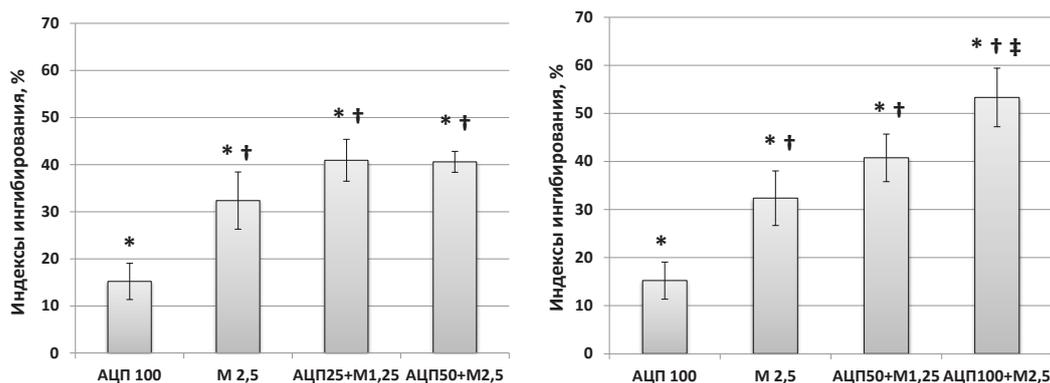


Рис. 3. Индексы ингибирования острой фазы воспалительной реакции на каррагенин у мышей за 5 ч наблюдения после введения N-ацетил-L-пролина (АЦП) в дозе 100 мг/кг, мелоксикама (М) 2,5 мг/кг и их комбинаций (по данным табл. 2), стандартная ошибка; различия достоверны ($p < 0,05$) в сравнении с плацебо (*), N-ацетил-L-пролином в дозе 100 мг/кг (†), мелоксикамом в дозе 2,5 мг/кг (‡)

Fig. 3. Inhibition indices of the acute phase of the inflammatory response to carrageenan in mice for a 5-hour observation period after administration of N-acetyl-L-proline, meloxicam, and their combinations (according to Tab. 2); $M \pm m$; differences are significant ($p < 0.05$) in comparison with placebo (*), N-acetyl-L-proline at a dose of 100 mg/kg (†), meloxicam at a dose of 2.5 mg/kg (‡)

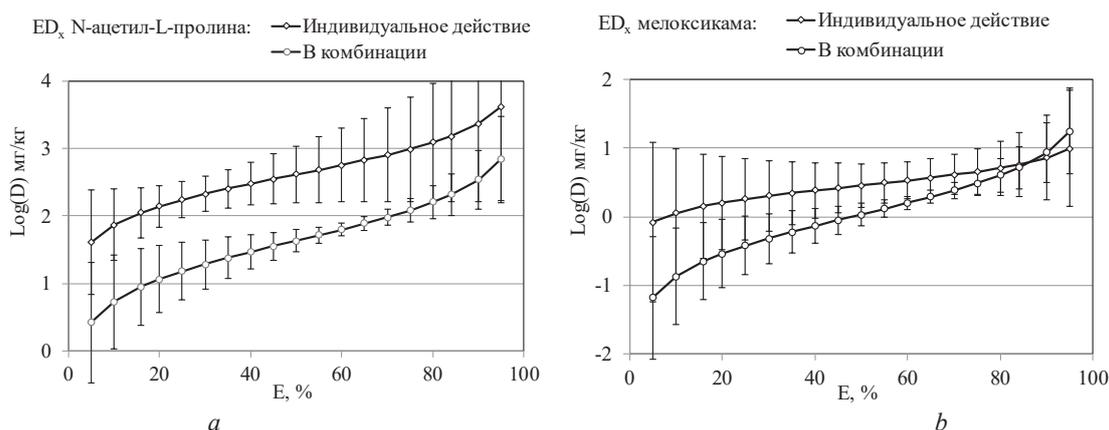


Рис. 4. Кривые регрессии доза–противовоспалительный эффект при индивидуальном действии N-ацетил-L-пролина (а), мелоксикама (б) и в составе комбинаторного сочетания в соотношении 40:1 на модели острого каррагенинового воспаления лапы у мышей (показаны 95 %-ные доверительные интервалы)

Fig. 4. Regression curves of the dose-inflammatory effect in the individual action of N-acetyl-L-proline (a), meloxicam (b) and as part of the combination in the ratio of 40:1 on the carrageenan acute paw inflammation in mice (95 % confidence intervals)

При комбинации N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в пороговых и субпороговых противовоспалительных дозах 25 + 1,25 и 50 + 2,5 мг/кг индексы ингибирования острой фазы воспалительного отека составили $41 \pm 4,5$ и $41 \pm 2,2$ % соответственно (см. табл. 1, 2, рис. 2, 3), что статистически значимо отличается от эффектов плацебо. Математический анализ результатов совместного действия мелоксикама и N-ацетил-L-пролина в соотношении 1:20 показал, что благодаря аддитивному характеру взаимодействия компонентов комбинации ED_{50} N-ацетил-L-пролина в составе комбинаторного сочетания дозы в 16 раз меньше, чем при индивидуальном применении, а ED_{50} мелоксикама в комбинации – в 2,3 раза меньше. Величина CI сочетания N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в соотношении 20:1 составила 0,50, что соответствует фармакологическому синергизму.

Таким образом, результаты изучения противовоспалительных свойств комбинации N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в сочетаниях 20:1 и 40:1 показали аддитивный характер взаимодействия компонентов. В нашем исследовании препараты демонстрировали умеренный и сильный фармакологический синергизм. Полученные данные, с одной стороны, имеют ценность в качестве

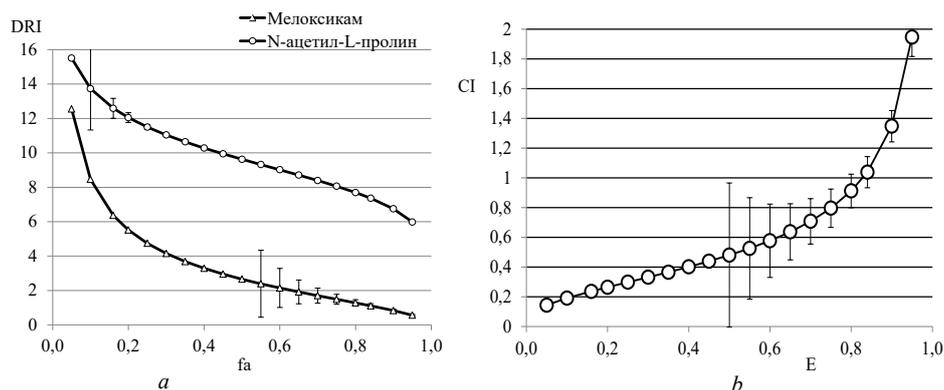


Рис. 5. Индекс снижения противовоспалительной дозы (*DRI*) N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в комбинации 40:1 (*a*) и комбинаторный индекс (*CI*) N-ацетил-L-пролина и мелоксикама в комбинации 40:1 (*b*) на модели острого каррагенинового воспаления лапы у мышей. *DRI* показывает, во сколько раз может быть снижена доза каждого компонента в синергичной комбинации для достижения эффекта, сопоставимого с индивидуальным действием препаратов (показаны 95 %-ные доверительные интервалы)

Fig. 5. Anti-inflammatory dose reduction index (*DRI*) of N-acetyl-L-proline and meloxicam in the combination in the ratio of 40:1 (*a*) and combinatorial index (*CI*) of N-acetyl-L-proline and meloxicam in the combination in the ratio of 40:1 (*b*) in acute carrageenan inflammation of the paw in mice. *DRI* shows how many times the dose of each component in a synergistic combination can be reduced to achieve an effect comparable to the individual effect of the drugs (95 % confidence intervals)

экспериментального обоснования приемлемости практического использования синергичной комбинации мелоксикама и N-ацетил-L-пролина. Другим важным результатом работы является анализ самого характера фармакологического взаимодействия атипичного НПВС N-ацетил-L-пролина и классического НПВС мелоксикама. Нетипичность N-ацетил-L-пролина как противовоспалительного средства заключается в уникальном спектре его фармакологических свойств, в первую очередь в отсутствии у препарата жаропонижающего и гастропатического эффектов [8, 9]. Ранее это позволило нам выдвинуть гипотезу о том, что механизм противовоспалительного и анальгетического действия N-ацетил-L-пролина не связан с ингибированием ЦОГ [9]. Данное предположение хорошо согласуется с результатами фармакологического взаимодействия N-ацетил-L-пролина с мелоксикамом на модели острого каррагенинового воспаления. Подобный аддитивный характер сочетанного действия компонентов комбинации, проявляющийся фармакологическим синергизмом от умеренного до сильного, возможен только при одновременном выполнении ряда условий – когда препараты (в данном случае N-ацетил-L-пролин и ингибитор ЦОГ-2 мелоксикам) имеют разные фармакодинамические мишени, не перекрывающийся соединением-конкурентом каскад амплификации сигнала и единый результат действия. В настоящем исследовании на примере фармакологического взаимодействия N-ацетил-L-пролина с мелоксикамом убедительно показана различная природа противовоспалительных эффектов субстанций.

Заключение. На модели острого каррагенинового воспаления лапы у мышей показано, что N-ацетил-L-пролин и мелоксикам в комбинаторных сочетаниях 20:1 и 40:1 обладают значительной противовоспалительной активностью. Эффект комбинации превышает индивидуальное действие аналогичных доз компонентов. Это имеет важное практическое значение, поскольку позволяет за счет уменьшения доз мелоксикама и N-ацетил-L-пролина минимизировать побочные эффекты и токсические риски.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Rainsford, K. D. Aspirin and related drugs / K. D. Rainsford. – London : Taylor and Francis, 2004. – 800 p.
2. A proline-rich polypeptide complex (PRP) isolated from ovine colostrum. Modulation of H₂O₂ and cytokine induction in human leukocytes / A. Zabłocka [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2007. – Vol. 7, N 7. – P. 981–988. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.02.012>
3. Oxaceprol, an atypical inhibitor of inflammation and joint damage / M. Ionac [et al.] // Pharmacol. Res. – 1996. – Vol. 33, N 6. – P. 367–373. <https://doi.org/10.1006/phrs.1996.0051>

4. Parnham, M. J. Antirheumatic agents and leukocyte recruitment. New light on the mechanism of action of oxaceprol / M. J. Parnham // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 58, N 2. – P. 209–215. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00056-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00056-8)
5. Effect of oxaceprol on the synthesis and degradation *in vitro* of proteoglycans and proteins by calf articular cartilage explants / H. Riera [et al.] // *Rev. Rheum. Mal. Osteoartic.* – 1990. – Vol. 57, N 7–8. – P. 579–583.
6. Harris, A. Effects of oxaceprol on the microcirculation in ischemia/reperfusion injury / A. Harris, A. Schropp, K. Messmer // *Eur. J. Med. Res.* – 1998. – Vol. 3, N 4. – P. 182–188.
7. Бизунок, Н. А. Производные аминокислот – потенциальные модификаторы клеточной продукции оксидантов / Н. А. Бизунок // *Рецепт.* – 2006. – № 3. – С. 28–32.
8. Волчек, А. В. Влияние атипичного НПВС N-ацетил L-пролина на пирогеналовую лихорадку / А. В. Волчек, Б. В. Дубовик // *Рецепт.* – 2008. – № 2. – С. 49–54.
9. Оценка ульцерогенного потенциала Оцепрола – НПВС из класса производных пролина / А. В. Волчек [и др.] // *Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы : материалы междунар. конф., Минск, 4–5 апр. 2003 г. / отв. ред. Е. Н. Смирнова.* – Минск, 2003. – С. 143–144.
10. Волчек, А. В. Изыскание противовоспалительных агентов среди производных пролина / А. В. Волчек, М. Б. Боква, Н. А. Бизунок // *Тр. молод. ученых. Юбилейное издание : сб. науч. работ / под общ. ред. С. Л. Кабака.* – Минск, 2001. – С. 37–39.
11. Myers, M. J. Molecular mechanism of action responsible for carrageenan-induced inflammatory response / M. J. Myers, C. M. Deaver, A. J. Lewandowski // *Mol. Immunol.* – 2019. – N 109. – P. 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.020>
12. Chou, T.-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T.-Ch. Chou // *Pharmacol. Rev.* – 2006. – Vol. 58, N 3. – P. 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

References

1. Rainsford K. D. *Aspirin and related drugs*. London, Taylor and Francis, 2004. 800 p.
2. Zabłocka A., Janusz M., Macała J., Lisowski J. A proline-rich polypeptide complex (PRP) isolated from ovine colostrum. Modulation of H₂O₂ and cytokine induction in human leukocytes. *International Immunopharmacology*, 2007, vol. 7, no. 7, pp. 981–988. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.02.012>
3. Ionac M., Parnham M. J., Plauchithiu M., Brune K. Oxaceprol, an atypical inhibitor of inflammation and joint damage. *Pharmacological Research*, 1996, vol. 33, no. 6, pp. 367–373. <https://doi.org/10.1006/phrs.1996.0051>
4. Parnham M. J. Antirheumatic agents and leukocyte recruitment. New light on the mechanism of action of oxaceprol. *Biochemical Pharmacology*, 1999, vol. 58, no. 2, pp. 209–215. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00056-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00056-8)
5. Riera H., Barbara A., Aprile F., Maheu E., Mitrovic D. Effect of oxaceprol on the synthesis and degradation *in vitro* of proteoglycans and proteins by calf articular cartilage explants. *Revue du rhumatisme et des maladies ostéo-articulaires*, 1990, vol. 57, pp. 579–583.
6. Harris A., Schropp A., Messmer K. Effects of oxaceprol on the microcirculation in ischemia/reperfusion injury. *European Journal of Medical Research*, 1998, vol. 3, no. 4, pp. 182–188.
7. Bizunok N. A. Derivatives of amino acids – potential modifiers of cell production of oxidants. *Retsept [Recipe]*, 2006, vol. 47, pp. 28–32 (in Russian).
8. Volchek A. V., Dubovik B. V. Effect of atypical NSAID N-acetyl L-proline on fever caused by pyrogenal. *Retsept [Recipe]*, 2008, no. 2, pp. 49–54 (in Russian).
9. Volchek A. V., Volynets B. A., Romanovskii D. I., Kuvaeva Z. I., Dubovik B. V. Evaluation of ulcerogenic potential of Oceprol NSAID from proline derivatives class. *Mediko-sotsial'naya ekologiya lichnosti: sostoyanie i perspektivy: Materialy mezhdunarodnoi konferentsii (Minsk, 4–5 aprelya 2003 goda)* [Medical and social ecology of personality: state and prospects: Materials of the international conference (Minsk, April 4–5, 2003)]. Minsk, 2003, pp. 143–144 (in Russian).
10. Volchek A. V., Bokova M. B., Bizunok N. A. Search for anti-inflammatory agents among proline derivatives. *Trudy molodykh uchenykh. Yubileinoe izdanie: sbornik nauchnykh rabot* [Proceedings of young scientists. Jubilee edition: collection of scientific works]. Minsk, 2001, pp. 37–39 (in Russian).
11. Myers M. J., Deaver C. M., Lewandowski A. J. Molecular mechanism of action responsible for carrageenan-induced inflammatory response. *Molecular Immunology*, 2019, vol. 109, pp. 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.020>
12. Chou T.-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 2006, vol. 58, no. 3, pp. 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

Информация об авторах

Волчек Александр Владимирович – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alexwolczek@gmail.com

Дубовик Борис Валентинович – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dubovik@bsmu.by

Information about the authors

Aliaksandr U. Vauchok – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alexwolczek@gmail.com

Barys V. Dubovik – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dubovik@bsmu.by

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.24-002-056.7-053.32-036:613.952

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-228-233>

Поступила в редакцию 27.02.2021

Received 27.02.2021

А. Н. Горячко, А. В. Сукало

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ВРОЖДЕННОЙ ПНЕВМОНИИ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА

Аннотация. Цель исследования – разработать прогностическую модель для определения вероятности развития врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела.

Обследовано 108 недоношенных новорожденных с низкой массой тела, находившихся в отделении анестезиологии и реанимации (с палатами для новорожденных детей) и педиатрическом отделении для недоношенных новорожденных.

Проведен сравнительный анализ 214 данных анамнеза жизни, исходов предыдущих беременностей, осложнений настоящей беременности у матерей, клинических и лабораторных методов исследования у новорожденных в первые трое суток жизни. В последующем определены наиболее значимые факторы, ассоциированные с развитием врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела: из акушерско-гинекологического анамнеза жизни матери – неразвивающаяся беременность (OR = 13,46 (10,11–17,91)) и самопроизвольный выкидыш (OR = 3,79 (2,69–5,35)); из осложнений настоящей беременности – хроническая фетоплацентарная недостаточность (OR = 3,47 (2,48–4,87)); по результатам гистологического исследования плаценты – изменения воспалительного характера (OR = 11,98 (8,84–16,23)); по клиническим данным младенца в первые трое суток жизни – наличие дыхательной недостаточности тяжелой степени (OR = 21,25 (15,69–28,77)).

С помощью прогностической модели рассчитаны пороговые значения указанных выше показателей: неразвивающаяся беременность – 0,727, самопроизвольный выкидыш – 0,445, хроническая фетоплацентарная недостаточность – 0,418, изменения воспалительного характера в плаценте – 0,688, дыхательная недостаточность III степени – 0,690, что позволяет отнести недоношенных новорожденных с низкой массой тела с пороговыми значениями $\geq 0,45$ к группе высокого риска развития врожденной пневмонии.

Ключевые слова: прогностическая модель, факторы риска, недоношенные новорожденные, врожденная пневмония, ROC-анализ

Для цитирования: Горячко, А. Н. Прогностическая модель для определения вероятности развития врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела / А. Н. Горячко, А. В. Сукало // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 228–233. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-228-233>

Alexander N. Harachka, Alexander V. Sukalo

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

PROGNOSTIC MODEL FOR DETERMINING THE PROBABILITY OF DEVELOPING CONGENITAL PNEUMONIA IN PRETERM INFANTS WITH LOW BODY WEIGHT

Abstract. The aim of the study was to create a prognostic model for determining the probability of developing congenital pneumonia in preterm infants with low body weight.

108 preterm infants with low body weight who were in the department of anesthesiology and resuscitation (with wards for newborns) and the pediatric department for preterm infants were examined.

A comparative analysis of 214 life history data, outcomes of previous pregnancies, complications of present pregnancy in mothers, clinical and laboratory methods of study in newborns in the first three days of life was carried out. Later, the most important factors associated with the development of congenital pneumonia in premature infants with low body weight were identified: from the obstetric and gynecological history of the mother's life – undeveloped pregnancy (RR = 13.46 (10.11–17.91)) and spontaneous miscarriage (RR = 3.79 (2.69–5.35)); the complications of this pregnancy, chronic fetoplacental insufficiency (RR = 3.47 (2.48–4.87)); the results of histological placenta examination – the changes in the inflammatory placenta (RR = 11.98 (8.84–16.23)); according to the clinical data of the infant in the first three days of life – the presence of severe respiratory failure (RR = 21.25 (15.69–28.77)).

Using the prognostic model, threshold values were calculated: for non-developing pregnancy – 0.727, spontaneous miscarriage – 0.445, chronic fetoplacental insufficiency – 0.418, changes in the inflammatory placenta – 0.688, severe respiratory

failure – 0.690, which, with threshold values of ≥ 0.45 , allows us to identify a high-risk group for the development of congenital pneumonia among premature infants with low body weight.

Keywords: prognostic model, risk factors, premature newborns, congenital pneumonia, ROC analysis

For citation: Harachka A. N., Sukalo A. V. Prognostic model for determining the probability of developing congenital pneumonia in preterm infants with low body weight. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 228–233 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-228-233>

Введение. По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации, в 2019 г. число недоношенных с врожденной пневмонией и массой тела более 1000 г регистрировалось на уровне 82,3 на 1000 родившихся живыми недоношенными, распространенность данного заболевания среди новорожденных с массой тела 500–999 г составила 227,8 %. Смертность от врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с массой тела 1000 г и более отмечалась на уровне 0,81 %, с массой тела 500–999 г – 10,8 %, что указывает на высокую заболеваемость и смертность от данной патологии среди недоношенных с низкой и экстремально низкой массой тела по сравнению с доношенными новорожденными (заболеваемость – 6,9 %, смертность – 0,056 %) [1].

Современная медицина производит и накапливает большие объемы информации. От того, насколько эффективно эти знания будут использоваться врачами, зависит качество медицинской помощи и общий уровень жизни населения. Создание математических моделей позволит ускорить обработку данных и упростить решение диагностических и терапевтических задач [2–4].

Цель исследования – разработать прогностическую модель для определения вероятности развития врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела.

Объекты и методы исследования. Проведено обследование 108 недоношенных новорожденных с низкой массой тела, находившихся в отделении анестезиологии и реанимации (с палатами для новорожденных детей) и педиатрическом отделении для недоношенных новорожденных Республиканского научно-практического центра «Мать и дитя» (РНПЦ «Мать и дитя»). Дети поступали на лечение и выхаживание из 22 роддомов и отделений анестезиологии и реанимации учреждений здравоохранения Республики Беларусь в период с 2017 по 2019 г.

Тип исследования – случай-контроль. Все новорожденные были разделены на две группы.

В исследуемую группу вошли 55 недоношенных новорожденных с низкой массой тела при рождении, синдромом дыхательных расстройств и врожденной пневмонией, родившихся в сроке гестации 35,0 (33,0–36,0) недель с массой тела 2080,0 (1870,0–2420,0) г, длиной тела 45,0 (42,0–46,0) см, окружностью головы 31,0 (31,0–33,0) см, окружностью груди 30,0 (28,0–31,0) см.

Группу сравнения составили 53 условно здоровых недоношенных с низкой массой тела при рождении и синдромом дыхательных расстройств, родившихся в сроке гестации 35,0 (35,0–36,0) недель с массой тела 2300,0 (2140,0–2400,0) г, длиной тела 45,0 (45,0–47,0) см, окружностью головы 32,0 (31,0–33,0) см, окружностью груди 30,0 (29,0–32,0) см.

При оценке показателей физического развития и срока гестации недоношенных новорожденных с низкой массой тела статистически значимых различий между группами не выявлено.

Критерии постановки диагноза «врожденная пневмония»: клинические и лабораторные данные, наличие инфильтративных теней на рентгенограмме легких в первые 72 ч жизни. Критерии исключения: антенатально выявленные пороки развития, наличие генетических заболеваний и хромосомной патологии, рождение в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий.

Проведен анализ анамнестических данных матерей обследованных детей: возраст, количество и исходы предыдущих беременностей, наличие гинекологических заболеваний и экстрагенитальной патологии, особенности течения беременности и родов.

Во всех случаях после родов проводили макроскопическое исследование последа с целью выявления дефектов материнской поверхности. В дальнейшем послед отправляли в Городское клиническое патологоанатомическое бюро г. Минска для гистологического исследования.

Средний возраст матерей новорожденных исследуемой группы составил $30,6 \pm 4,94$ (29,2–31,9) года, возраст женщин группы сравнения – $30,7 \pm 5,71$ (29,1–32,3) года. Статистически значимых различий между группами не выявлено.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакетов программ Statistica 10 и Microsoft Excel. Нормальность распределения количественных признаков оценивали тестами Колмогорова–Смирнова и Лиллиефорса. При нормальном распределении величин рассчитывали среднее и его среднеквадратичное отклонение ($M \pm SD$) с указанием доверительного интервала ($\pm 95,5\%$ ДИ), критерий Стьюдента (t), при отличном от нормального – медиану (Me) и интерквартильный размах (25 %; 75 %), критерий Манна–Уитни (U). Для определения статистически значимых различий качественных величин использовали метод хи-квадрат Пирсона (χ^2), уточняющий критерий с поправкой Йетса ($\chi^2_{\text{Й}}$) или точный критерий Фишера (F), уточняющий критерий – Фишер двусторонний ($F_{\text{дв}}$). При статистически значимых различиях проводился расчет отношения шансов (OR) с доверительным интервалом ($\pm 95\%$ ДИ). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [5, 6].

Прогностическую ценность факторов, ассоциированных с развитием врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела, оценивали с помощью бинарной логистической регрессии, анализа ROC-кривой, отрицательного удвоенного логарифма функции правдоподобия ($-2LL$) и меры определенности (R^2 Нэйджелкерка). Использование данных для построения модели основывалось на гипотезе, объеме выборки и отсутствии между факторами статистически значимых корреляционных связей [6].

Карты обследования новорожденных детей и информированное согласие родителей на выполнение исследований были утверждены на заседании комиссии по медицинской этике ГУ «РНПЦ «Мать и дитя».

Результаты и их обсуждение. На основании анамнеза перенесенных матерями заболеваний, данных акушерско-гинекологического и соматического статуса проведена оценка по наиболее часто встречаемым факторам. По результатам отношения шансов наиболее статистически значимыми факторами у матерей новорожденных исследуемой группы в сопоставлении с данными группы сравнения доля женщин с неразвивающейся беременностью (НБ) ($F_{\text{дв}} = 0,15$, $p < 0,001$, OR = 13,46 (10,11–17,91)) и самопроизвольным выкидышем (СВ) ($F_{\text{дв}} = 0,05$, $p = 0,033$, OR = 3,79 (2,69–5,35)) была статистически значимо больше [7–9].

Изучение осложнений настоящей беременности показало, что у матерей новорожденных исследуемой группы по сравнению с матерями младенцев из группы условно здоровых детей и группы контроля статистически значимо чаще наблюдались синдром задержки развития плода ($F = 0,07$, $p = 0,005$, OR = 11,56 (8,70–15,35)), хроническая фетоплацентарная недостаточность (ХФПН) ($\chi^2_{\text{Й}} = 6,20$, $p = 0,013$, OR = 3,47 (2,48–4,87)), угроза прерывания беременности ($\chi^2_{\text{Й}} = 5,36$, $p = 0,021$, OR = 2,73 (1,76–4,23)) [7–10].

Проведен сравнительный анализ постнатальных факторов, ассоциированных с развитием врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела.

Осложнением врожденной пневмонии у всех детей исследуемой группы являлась дыхательная недостаточность (ДН) I степени – у 12 (21,8 %), II степени – у 18 (32,7 %) и III степени – у 25 (45,5 %) младенцев. В группе сравнения ДН I степени наблюдалась у 34 (64,2 %) новорожденных, II степени – у 11 (20,8 %), III степени – у 2 (3,8 %) младенцев, 6 (11,3 %) недоношенных новорожденных ДН не имели. Таким образом, доля недоношенных детей в исследуемой группе, имеющих ДН III степени, была статистически значимо больше, чем в группе условно здоровых новорожденных ($F = 0,23$, $p < 0,001$, OR = 21,25 (15,69–28,77)) [11].

По данным гистологического исследования плаценты, у 23 (41,8 %) матерей недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией по сравнению с 3 (5,7 %) матерями группы сравнения статистически значимо чаще выявлялись изменения в плаценте воспалительного характера (ИПВХ) ($F_{\text{дв}} = 0,18$, $p < 0,001$, OR = 11,98 (8,84–16,23)), а у 15 (27,3 %) матерей исследуемой группы частота встречаемости серозных изменений в плаценте была статистически значимо больше, чем у 3 (5,7 %) условно здоровых женщин ($F_{\text{дв}} = 0,08$, $p = 0,004$, OR = 6,25 (4,58–8,25)). Гнойно-некротических изменений в плаценте у матерей группы сравнения в период обследования не выявлено [12–14].

В последующем определены наиболее значимые факторы, ассоциированные с развитием врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела. На основании бинарной

логистической регрессии и ROC-анализа выведена прогностическая модель с универсальным критерием коэффициента $\chi^2 = 59,89$, $p < 0,001$, что свидетельствует о ее высокой статистической значимости. При выборе модели учитывали объем выборки, отсутствие между факторами статистически значимых корреляционных связей и возможность включения исследуемых факторов в зависимости от числа наблюдений (табл. 1).

Таблица 1. Переменные в уравнении прогностической модели

Table 1. Variables in the predictive model equation

Переменные	B	S. E.	Wald	df	Sig	EXP (B)	95 % CI for EXP (B)	
							Lower	Upper
СВ	1,598	0,851	3,525	1	0,060	4,944	0,932	26,223
НБ	2,795	1,190	5,521	1	0,019	16,36	1,590	168,411
ХФПН	1,488	0,600	6,147	1	0,013	4,427	1,366	14,349
ИПВХ	2,606	0,757	11,843	1	0,001	13,54	3,070	59,726
ДН III степени	2,619	0,740	12,511	1	0,000	13,72	3,214	58,545
Константа	-1,816	0,404	20,196	1	0,000	0,163		

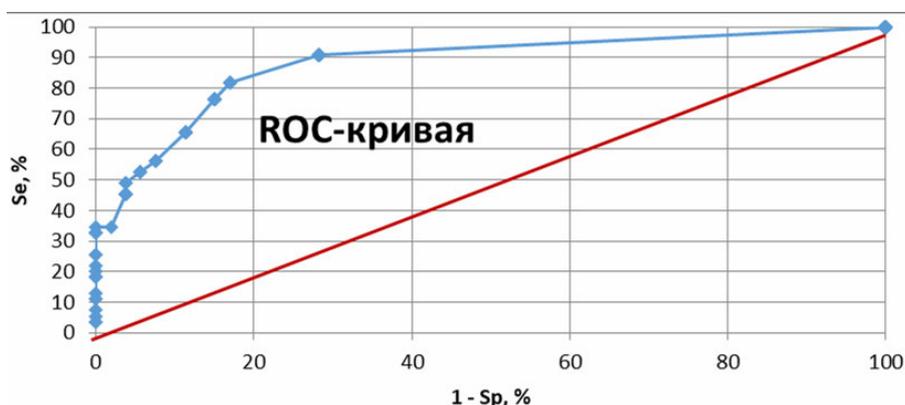
Для представления работоспособности разработанной математической модели в табл. 2 приведены параметры с указанием отрицательного удвоенного логарифма ($-2LL$) функции правдоподобия и меры определенности.

Таблица 2. Параметры прогностической модели развития врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела

Table 2. Parameters of the prognostic model of the development of congenital pneumonia in premature infants with low body weight

Модель	$-2LL$	R^2
$p = 1/(1 + e^{(-1,82 + 1,60СВ + 2,80НБ + 1,49ХФПН + 2,61ИПВХ + 2,62ДНIII)})$	89,79	0,568

ROC-кривая, являясь графической характеристикой качества бинарного классификатора, указывает на зависимость доли верных положительных результатов от доли ложных положительных результатов при варьировании значений оптимального порога [3]. На данной кривой оптимальный порог $\geq 0,45$. Следовательно, пороговые значения $\geq 0,45$ показывают высокую вероятность наличия врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела (см. рисунок).



ROC-кривая прогностической модели развития пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела

ROC-curve of the prognostic model for the development of pneumonia in full-term newborns

Для данной модели определена чувствительность и специфичность. Чувствительность, отражающая долю положительных результатов, которые правильно идентифицированы как доля больных, была равна 81,8 %. Специфичность, отражающая долю отрицательных результатов, которые правильно идентифицированы как доля здоровых, – 83,0 %, площадь под ROC-кривой (AUC) – $0,88 \pm 0,056$ (0,82–0,95), $p < 0,001$.

Выводы

1. В результате проведенного исследования установлены наиболее значимые факторы, ассоциированные с развитием врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с низкой массой тела: из акушерско-гинекологического анамнеза жизни матери – неразвивающаяся беременность и самопроизвольный выкидыш; из осложнений настоящей беременности – хроническая фетоплацентарная недостаточность; по результатам гистологического исследования плаценты – изменения воспалительного характера; по клиническим и лабораторным данным младенца в первые трое суток жизни – наличие дыхательной недостаточности тяжелой степени.

2. С помощью прогностической модели рассчитаны пороговые значения указанных выше показателей: неразвивающаяся беременность – 0,727, самопроизвольный выкидыш – 0,445, хроническая фетоплацентарная недостаточность – 0,418, изменения воспалительного характера в плаценте – 0,688, дыхательная недостаточность III степени – 0,690, что позволяет отнести недоношенных новорожденных с низкой массой тела с пороговыми значениями $\geq 0,45$ к группе высокого риска развития врожденной пневмонии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № M17-002, сроки выполнения 18.04.2017–31.03.2019.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the project of the Belarusian Republican Foundation for Basic Study No. M17-002, completion date 18.04.2017–31.03.2019.

Список использованных источников

1. Основные показатели здоровья матери и ребенка, деятельность службы охраны детства и родовспоможения в Российской Федерации за 2019 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://mednet.ru/miac/meditsinskaya-statistika>. – Дата доступа: 10.02.2021.
2. Горячко, А. Н. Прогностическая модель для определения вероятности развития врожденной пневмонии у доношенных новорожденных / А. Н. Горячко, А. В. Сукало // Здоровья дитини. – 2019. – Т. 14, № 4. – С. 256–261.
3. Горячко, А. Н. Экспресс-метод для определения вероятности развития врожденной пневмонии / А. Н. Горячко, А. В. Сукало // Здоровья дитини. – 2020. – Т. 15, № 2. – С. 120–126.
4. Влияние антропогенных поллютантов атмосферы на распространенность врожденных пороков развития среди новорожденных / Н. М. Агарков [и др.] // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65, № 6. – С. 34–41.
5. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
6. Петри, А. Наглядная медицинская статистика / А. Петри, К. Сэбин. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 216 с.
7. Interventions to address deaths from childhood pneumonia and diarrhoea equitably: what works and at what cost / Z. A. Bhutta [et al.] // Lancet. – 2013. – Vol. 381, N 9875. – P. 1417–1429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60648-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60648-0)
8. Косьянчук, А. В. Инфекционный фактор у женщин с неразвивающейся беременностью и хроническим эндометритом / А. В. Косьянчук // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа : материалы 10-го съезда акушеров-гинекологов и неонатологов Респ. Беларусь, Минск, 9–10 нояб. 2017 г. – Минск, 2017. – Т. 5. – С. 791–795.
9. Bottlenecks, barriers and solutions: results from multicountry consultations focused on reduction of childhood pneumonia and diarrhoea deaths / C. J. Gill [et al.] // Lancet. – 2013. – Vol. 381, N 9876. – P. 1487–1498. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60314-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60314-1)
10. Малевич, Ю. К. Фетоплацентарная недостаточность / Ю. К. Малевич, В. А. Шостак. – Минск : Беларусь, 2007. – 157 с.
11. Врожденная пневмония (клинические рекомендации) / А. Г. Антонов [и др.] // Неонатология : новости, мнения, обучение. – 2017. – № 4 (18). – С. 133–148.
12. Воспалительные изменения в плаценте и бактериальная инфекция у недоношенных новорожденных с дыхательной недостаточностью / С. А. Перепелица [и др.] // Общ. реаниматология. – 2012. – Т. 8, № 3. – С. 18–24. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2012-3-18>
13. McGuire, W. Infection in the preterm infant / W. McGuire, L. Clerihew, P. W. Fowlie // BMJ. – 2004. – Vol. 329, N 7477. – P. 1277–1280. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7477.1277>
14. Низяева, Н. В. Гистологические критерии воспалительных изменений плодных оболочек плаценты и пуповины / Н. В. Низяева // Междунар. журн. прикл. и фундамент. исслед. – 2018. – № 3. – С. 180–188.

References

1. *The main indicators of maternal and child health, activities of the child protection and maternity services in the Russian Federation: 2019*. Available at: <https://mednet.ru/miac/meditsinskaya-statistika> (accessed 10.02.2021) (in Russian).
2. Goryachko A. N., Sukalo A. V. Prognostic model for determining the probability of congenital pneumonia in full-term newborns. *Zdorov'ya ditini* [Child health], 2019, vol. 14, no. 4, pp. 256–261 (in Russian).
3. Goryachko A. N., Sukalo A. V. Express method for determining the probability of developing congenital pneumonia in full-term newborns. *Zdorov'ya ditini* [Child health], 2020, vol. 15, no. 2, pp. 120–126 (in Russian).
4. Agarkov N. M., Churnosov M. I., Osipova O. A., Sharapova O. V., Modestov A. A., Korovin E. N., Ekkert N. V. Effect of anthropogenic atmospheric pollutants on the prevalence of congenital malformations in newborns. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii* [Russian bulletin of perinatology and pediatrics], 2020, vol. 65, no. 6, pp. 34–41 (in Russian).
5. Rebrova O. Yu. *Statistical analysis of medical data. Using the STATISTICA Application Package*. Moscow, MediaSfera Publ., 2002. 312 p. (in Russian).
6. Petrie A., Sabin C. *Medical Statistics at a Glance. 3rd ed.* Malden, Massachusetts, Wiley-Blackwell, 2009. 180 p. (Russ. ed. Petri A., Sebin K. *Naglyadnaya meditsinskaya statistika*. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2015. 216 p.).
7. Bhutta Z. A., Das J. K., Walker N., Rizvi A., Campbell H., Rudan I., Black R. E. Interventions to address deaths from childhood pneumonia and diarrhoea equitably: what works and at what cost. *Lancet*, 2013, vol. 381, no. 9875, pp. 1417–1429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60648-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60648-0)
8. Kos'yanchuk A. V. Infectious factor in women with non-developing pregnancy and chronic endometritis. *Reproduktivnoe zdorov'e. Vostochnaya Evropa: materialy 10-go s'ezda akusherov-ginekologov i neonatologov Respubliki Belarus' (Minsk, 9–10 noyabrya 2017 goda)* [Reproductive health. Eastern Europe: Proceedings of the 10th congress of obstetricians-gynecologists and neonatologists of the Republic of Belarus (Minsk, November 9–10, 2017)]. Minsk, 2017, vol. 5, pp. 791–795 (in Russian).
9. Gill C. J., Young M., Schroder K., Carvajal-Velez L., McNabb M., Aboubaker S., Qazi S., Bhutta Z. A. Bottlenecks, barriers and solutions: results from multicountry consultations focused on reduction of childhood pneumonia and diarrhoea deaths. *Lancet*, 2013, vol. 381, no. 9876, pp. 1487–1498. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60314-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60314-1)
10. Malevich Yu. K., Shostak V. A. *Placental insufficiency*. Belarus Publ., 2007. 157 p. (in Russian).
11. Antonov A. G., Baibarina E. N., Balashova E. N., Degtyarev D. N., Zubkov V. V., Ivanov D. O. [et al.]. Congenital pneumonia (clinical guidelines). *Neonatologiya: novosti, mneniya, obuchenie* [Neonatology. News, opinions, training], 2017, no. 4 (18), pp. 133–148 (in Russian).
12. Perepelitsa S. A., Golubev A. M., Moroz V. V., Alekseeva S. V., Mel'nichenko V. A. Placental inflammatory changes and bacterial infection in premature neonates with respiratory failure. *Obshchaya reanimatologiya* [General resuscitation], 2012, vol. 8, no. 3, pp. 18–24 (in Russian).
13. McGuire W., Clerihew L., Fowle P. W. Infection in the preterm infant. *BMJ*, 2004, vol. 329, no. 7477, pp. 1277–1280. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7477.1277>
14. Nizyaeva N. V. Histological criteria for inflammatory changes in the membranes of the placenta and umbilical cord. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* [International journal of applied and basic research], 2018, no. 3, pp. 180–188 (in Russian).

Информация об авторах

Горячко Александр Николаевич – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: goryachko1966@mail.ru

Сукало Александр Васильевич – академик, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Alexander N. Harachka – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: goryachko1966@mail.ru

Alexander V. Sukalo – Academician, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus).

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

UDC 616.89-008.441.44-055.1-053.7

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-234-243>

Received 01.02.2021

**Siarhey V. Davidouski¹, Janna A. Ibragimova², Darya D. Kastsiuk³, Nikolay N. Leonov⁴,
Yuri M. Mikitski⁵, Maryna M. Skuhareuskaya², Andrey N. Tretyk⁶, Vadzim V. Kuzhal⁶**

¹*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus*

²*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

³*Institute of Psychology of the University of Wrocław, Wrocław, Poland*

⁴*Institute of Sociology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

⁵*Republican Unitary production enterprise "ACADEMPHARM", Minsk, Republic of Belarus*

⁶*Republican Research and Practice Mental Health Center, Minsk, Republic of Belarus*

ANALYSIS OF SOCIO-PSYCHOLOGICAL FACTORS ASSOCIATED WITH SUICIDAL BEHAVIOR IN PERSONS OF MILITARY AGE

Abstract. Currently, the Armed Forces are facing the problem of the death of personnel who committed suicide, which makes it important to look for the reasons of suicidal behavior.

The study involved 169 men, divided into two groups: the first group consisted of persons of military age, in the amount of 115 people and the second group included 54 people who committed parasuicide using highly lethal methods of self-harm (GLIVS). During the study, socio-demographic characteristics (age, marital status, living conditions, professional status, characteristics and conditions of upbringing) and individual psychological personality traits (type of temperament, introversion-extraversion, neuroticism, ostentatiousness, fixedness, formalism, excitability, hyperthymia, dysthymia, anxiety, exaltation, affectability, cyclothymia) were assessed. The calculations were performed using the statistical package IBM SPSS Statistics 22.

Statistically significant differences between the study groups were due to the presence of differences between persons brought up in two-parent families. These groups differed in the phlegmatic type of temperament (predominant in GLIVS), the character traits of excitability, dysthymia, and hyperthymia. For GLIVS brought up in two-parent families, in addition to the phlegmatic type of temperament, it was characterized by the presence of punishments in childhood, a lower level of education (secondary education prevailed), a lower level of neuroticism, excitability, dysthymia and anxiety, an average level of hyperthymicity.

Statistically significant differences between the study groups were revealed in terms of the type of temperament, excitability, dysthymism, and hypotensiveness and were due to the presence of differences between persons brought up in full families.

Individuals from full families of GLIVS are characterized by the presence of more frequent punishments in childhood, a phlegmatic type of temperament, a lower level of education, a lower level of neuroticism, excitability, dysthymia, anxiety.

Keywords: suicide, full family, single-parent family, temperament, personality traits

For citation: Davidouski S. V., Ibragimova J. A., Kastsiuk D. D., Leonov N. N., Mikitski Yu. M., Skuhareuskaya M. M., Tretyk A. N., Kuzhal V. V. Analysis of socio-psychological factors associated with suicidal behavior in persons of military age. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 234–243. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-234-243>

**С. В. Давидовский¹, Ж. А. Ибрагимова², Д. Д. Костюк³, Н. Н. Леонов⁴, Ю. М. Микицкий⁵,
М. М. Скугаревская², А. Н. Третьяк⁶, В. В. Кужал⁶**

¹*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь*

²*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*

³*Институт психологии Вроцлавского государственного университета, Вроцлав, Польша*

⁴*Институт социологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

⁵*Республиканское производственное унитарное предприятие «Академфарм», Минск, Республика Беларусь*

⁶*Республиканский научно-практический центр психического здоровья, Минск, Республика Беларусь*

АНАЛИЗ СОЦИАЛЬНО-ПСИХОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С СУИЦИДАЛЬНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ ЛИЦ ПРИЗЫВНОГО ВОЗРАСТА

Аннотация. В настоящее время достаточно остро стоит проблема гибели личного состава в Вооруженных Силах. одной из причин которой является суицид. Это делает актуальным поиск причин и факторов, обуславливающих суицидальное поведение.

В исследовании приняли участие 169 мужчин, разделенных на две группы: первая группа состояла из 115 лиц призывного возраста, вторая – из 54 человек, совершивших парасуицид с использованием высокотетальных способов самоповреждения (далее – ГЛИВС). При проведении исследования оценивали социально-демографические

характеристики (возраст, семейный статус, условия проживания, профессиональный статус, особенности и условия воспитания) и индивидуально-психологические черты личности (тип темперамента, интроверсия-экстраверсия, нейротизм, демонстративность, застревание, педантичность, возбудимость, гипертимность, дистимность, тревожность, экзальтированность, эмотивность, циклотимность). Расчеты проводили с использованием статистического пакета программ IBM SPSS Statistics 22.

Статистически значимые различия между исследуемыми группами были обусловлены наличием различий между лицами, воспитанными в полных семьях. Обследуемые данных групп различались по флегматическому типу темперамента (преобладал в ГЛИВС) и чертам характера (возбудимость, дистимичность и гипертимность). Для лиц из группы ГЛИВС, воспитанных в полных семьях, кроме флегматического типа темперамента было характерно наличие наказаний в детстве, более низкие уровни образования (преобладало среднее), нейротизма, возбудимости, дистимности и тревожности, средний уровень гипертимности.

Статистически значимые различия между обследуемыми выявлены по таким показателям, как тип темперамента, возбудимость, дистимность и гипертимность, и были обусловлены наличием различий между лицами, воспитанными в полных семьях.

Для лиц из полной семьи группы ГЛИВС характерно наличие более частых наказаний в детстве, флегматический тип темперамента, более низкий уровень образования, более низкий уровень нейротизма, возбудимости, дистимности и тревожности.

Ключевые слова: суицид, полная семья, неполная семья, темперамент, черты характера

Для цитирования: Анализ социально-психологических факторов, сопряженных с суицидальным поведением лиц призывного возраста / С. В. Давидовский [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 234–243 (на англ. яз.). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-234-243>

Introduction. Loss of military personnel in the Armed Forces is currently very urgent. One of the reasons for this is suicide. More than 80 % of suicides in the army are committed by members of the armed forces and those who do military service on conscription, including 2/3 of first-year soldiers [1], that requires careful study.

Objects and research methods. The study involved 169 men, divided into two groups: the first group consisted of people of military age and consisted of 115 people (GMA), the second group included persons who had suicidal attempt with high probability of death (mainly hanging) (GSAD) and consisted of 54 people. At the time of the examination they were undergoing treatment at the State Institution “Republican Research and Practice Mental Health Center”, Minsk, Republic of Belarus.

Therefore one of the main variables was whether the sample subject belonged to one of these groups. Other variables in the sample were socio-demographic characteristics (age, marital status, living conditions, occupational status, characteristics and conditions of upbringing) and Eysenck Personality Questionnaire and the Leonhard–Schmischek test (type of temperament, introversion-extraversion, neuroticism, ostentatiousness, fixedness, formalism, excitability, hyperthymia, dysthymia, anxiety, exaltation, affectability, cyclothymia). The respondents who, at the time of the examination, had an Eysenck Lie Scale score of 5 or higher were excluded from the survey.

In the analysis, some of the nominal variables were reduced to a dichotomous form. Thus, the features of child-rearing with the values “full family”, “single-parent family”, and “orphan” are reduced to a variable with two values: “full family” and “single-parent family, orphan”. Child-rearing features with the values “were not punished”, “rarely punished”, “often punished”, are mainly reflected by the variable with the values “were not punished”, “were punished”.

The results of the Leonhard-Schmischek Test are measured on a point ordinal scale and range from 0 to 24. The following grouping was used for them: 0–12 – type of accentuation is not expressed, 13–18 – tendency to one or another type of accentuation, 19–24 – severity of type of accentuation. The grouping intervals were ordinal variables.

The hypothesis of a statistical relationship between the variables was tested using the χ^2 test at the standard significance level of $p \leq 0.05$. The effect size (strength of relationship) was estimated using Cramer coefficient for nominal variables (also recommended for estimating the strength of relationship between nominal and ordinal variables [2]) and Goodman–Kruskal γ -coefficient for ordinal variables [3]). When the permissible level of significance is exceeded ($p > 0.05$), the value of the Cramer coefficient and γ -coefficient was not indicated in the Table.

Since the analysis involved dichotomous variables that under certain approach can be classified as both nominal and ordinal, the values of both coefficients were given for comparison in all cases.

Assuming that the distances between scale gradations are perceived equally, the Leongard–Schmischek test scores can be considered quasi-interval, or quasi-quantitative variables. In this case, the difference is defined on the scale (as on the scale of interval), and arithmetic operations are applicable to it, in particular, the calculation of the arithmetic mean and variance [2]. With this in mind, when significant differences were found between distributions of grouping intervals, the means observations of the corresponding quasi-quantitative variables were also compared, giving greater clarity to the results. To compare the means we used Student's *t*-test, which is considered robust (stable) to deviations of the initial data distributions from normal distribution even for small samples (about 30), which was almost always performed in our study. The calculations were performed using the statistical package IBM SPSS Statistics 22.

The aim of the study is to establish a link between belonging to a group and socio-psychological factors.

Results and its discussion. As Tab. 1 shows, the age of the participants in the study groups differed significantly.

Table 1. Age distribution in the study groups

Indicator	GMA*		GSAD	
	under 21 years (<i>n</i> = 52)	21 years or older (<i>n</i> = 52)	under 40 years (<i>n</i> = 28)	40 years or older (<i>n</i> = 26)
Age, years	19	22	30	54
Average age	21		42	

* 11 people had no data on age.

Differences in age seem to have led to differences between the groups in family status and living conditions (Tab. 2, 3).

Table 2. Distribution of the study groups depending on the marital status

Marital status	GMA (<i>n</i> = 115)	GSAD (<i>n</i> = 54)
Quantity		
Married	4.3 %	38.9 %
Single	89.6 %	35.2 %
Civil marriage	6.1 %	7.4 %
Divorced		13.0 %
Widower		5.5 %

Table 3. Distribution of the study groups depending on the living conditions

Living conditions	GMA (<i>n</i> = 114)	GSAD (<i>n</i> = 54)
With a family	4.4 %	35.2 %
Alone	14.0 %	35.2 %
With a partner	6.1 %	13.0 %
With parents	74.6 %	14.8 %
Other	0.9 %	1.8 %

In GSAD, where the average age was 42, more than a third of the men (35.3 %) were single and an equal number (35.2 %) lived alone. In GMA, where the average age was 21, unmarried people prevailed, who mostly lived with their parents (74.65 %). However, these differences did not reflect real differences between the groups studied because the age of 21 is the beginning of a life journey, which is further associated with the formation of a family and changes in living conditions.

At the beginning of the study the relationship between belonging to the study group and the characteristics of child-rearing (growing up either in a two-parent family or in a single-parent family) was tested, which is reflected in Tab. 4, 5.

Table 4. Child-rearing features depending on the study groups

Child-rearing features	GMA (n = 109)	GSAD (n = 53)
Two-parent family	68.8 %	64.2 %
Single-parent family, orphan	31.2 %	35.8 %
<i>p</i>	0.553	

Note. *p* – level of significance achieved.

Table 5. Study groups and the child-rearing features

Child-rearing features	Two-parent family (n = 109)	Single-parent family, orphan (n = 53)
GMA	68.8 %	64.2 %
GSAD	31.2 %	35.8 %
<i>p</i>	0.553	

GMA and GSAD group percentages and two-parent families and single-parent families group percentages in family sample coincided and were 67.3 and 32.7 %, respectively. Tab. 4 follows that in both groups the number of individuals raised in two-parent families was greater than in single-parent families; the distributions were almost indistinguishable and to the ratio of the shares of two-parent and single-parent families in the sample.

The absence of a significant relation between child-rearing conditions and group membership allowed statistical analysis to be performed not only according to the study group membership, but also according to the child-rearing conditions. Nowadays not being raised in a two-parent family is considered to be one of the factors responsible for the development of a variety of mental disorders (psychoactive substances abuse, schizophrenia, depression) among adults including the formation of suicidal behavior. The further analysis of the variables is performed as follows:

1) for the entire sample and for each study group (GMA, GSAD) the connection between the variable being studied and child-rearing conditions is checked (growing up in a two-parent or single-parent family);

2) for the entire sample and each child-rearing conditions its relation to the study group was tested.

No statistically significant differences could be found in assessing the presence of a connection between the child-rearing features (presence or absence of parental punishment and its severity) and group membership. It can only be noted that those who were punished in single-parent families dominated, regardless of their study group membership (Tab. 6).

Table 6. Child-rearing features depending on the child-rearing conditions and the study groups

Child-rearing features	The entire sample		Two-parent family		Single-parent family	
	GMA (n = 115)	GSAD (n = 54)	GMA (n = 75)	GSAD (n = 34)	GMA (n = 34)	GSAD (n = 19)
Were not punished	49.6 %*	20.4 %*	53.3 %*	23.5 %*	38.2 %	15.8 %
Were punished	50.4 %*	79.6 %*	46.7 %*	76.5 %*	61.8 %	84.2 %
<i>p</i>	0.000		0.004		0.088	
Cramer's coefficient	0.278		0.278			
γ -coefficient	0.587		0.576			

*Significance at the $p \leq 0.05$ level. The same in Tab. 7, 10–18.

A statistically significant connection of child-rearing conditions to a group membership was found only for those from two-parent families (Tab. 6). In the GMA group, the proportion of those raised in two-parent families who were not punished was more than half (53.3 %), in the GSAD it was 23.5 %. Thus, in contrast to GMA, persons from two-parent families in GSAD have the “punishment in childhood” factor. When comparing the groups on the indicator “level of education”, statistically significant differences were found depending on the child-rearing conditions, taking into account the factor

of group membership (Tab. 7). Among those raised in a single-parent family, individuals with secondary and secondary professional education predominated in the GMA group, in contrast to those raised in two-parent families. On this basis, it can be assumed that being raised in a single-parent family encourages young people to enter the profession early.

Table 7. Education level depending on the child-rearing conditions and the study groups

Education	The entire sample		Two-parent family		Single-parent family	
	GMA (<i>n</i> = 115)	GSAD (<i>n</i> = 54)	GMA (<i>n</i> = 69)	GSAD (<i>n</i> = 34)	GMA (<i>n</i> = 31)	GSAD (<i>n</i> = 19)
Higher	35.2 %*	16.7 %*	39.1 %*	14.7 %*	32.3 %	21.1 %
Secondary professional	44.8 %	42.6 %	36.2 %	41.2 %	58.1 %	47.4 %
Secondary	9.5 %*	31.5 %*	13.0 %*	38.2 %*	3.2 %	21.1 %
Incomplete higher	10.5 %	5.6 %	11.6 %	2.9 %	6.5 %	5.3 %
Incomplete secondary		3.7 %		2.9 %		5.3 %
<i>p</i>	0.001		0.004		0.186	
Cramer's coefficient	0.348		0.385			
γ -coefficient	0.163		0.305			

For those who grew up in a two-parent family, there was a statistically significant relation between the level of education and group membership, which manifested itself in the following patterns:

1. The proportion of persons with higher education in the GMA group is higher than in the GSAD group (39.1 % vs 14.7 %), despite differences in age. It can be increased by another 11.6 % due to the transition to it individuals from the category of incomplete higher education.

2. Only a small number of persons in the PCA group had a secondary education (13.0 %), and the proportion of these persons may be decreasing in the future. In GSAD more than one-third had no professional education (38.2 %). A change in the educational status of these individuals is unlikely in the future. Thus, the level of education was higher among GMA s raised in a two-parent family, despite marked age differences between the study groups. In assessing professional status only a few patterns emerged. They depend on child-rearing conditions (Tab. 8).

Table 8. Professional status depending on the child-rearing conditions and the study groups

Professional status	The entire sample		Two-parent family		Single-parent family	
	GMA B (<i>n</i> = 112)	GSAD (<i>n</i> = 54)	GMA (<i>n</i> = 74)	GSAD (<i>n</i> = 34)	GMA (<i>n</i> = 32)	GSAD (<i>n</i> = 19)
Those who work	73.2 %	64.8 %	77.0 %	58.8 %	68.8 %	73.7 %
Those who do not work	18.8 %	31.5 %	17.6 %	35.3 %	18.8 %	26.3 %
Pupils, students, retired	8.0 %	3.7 %	5.4 %	5.9 %	12.5 %	
<i>p</i>	0.137		0.119		0.255	
Cramer's coefficient						
γ -coefficient						

The majority of the participants worked despite marked age differences between the groups. However, the most significant connection (the achieved significance level of 0.119) was between the professional status and group membership for those who grew up in a two-parent family. In this category, the percentage of non-workers in the GMA group was 17.6 % and in the suicide group 35.3 %.

Examining the relationship of the temperament type with the other two variables statistically significant differences were obtained between the groups under study, and between the child-rearing conditions (Tab. 9, 10).

It was found that a phlegmatic type of temperament predominated among those who were born and raised in two-parent families in this group (60.7 %). The predominant type of temperament in the PCA group was melancholic regardless of child-rearing conditions.

Table 9. Temperament type depending on the group membership and the child-rearing conditions

Temperament type	The entire sample		GMA		GSAD	
	Two-parent family (n = 100)	Single-parent family (n = 51)	Two-parent family (n = 72)	Single-parent family (n = 33)	Two-parent family (n = 28)	Single-parent family (n = 18)
Melancholic	56.0 %	51.0 %	65.3 %	54.5 %	32.1 %	44.4 %
Sanguine	4.0 %	5.9 %	5.6 %	3.0 %		11.1 %
Phlegmatic	27.0 %	23.5 %	13.9 %	27.3 %	60.7 %*	16.7 %*
Choleric	13.0 %	19.6 %	15.3 %	15.2 %	7.1 %	27.8 %
<i>p</i>	0.673		0.397		0.009	
Cramer's coefficient					0.500	
γ -coefficient					0.057	

Table 10. Temperament type depending on the child-rearing conditions and the group membership

Temperament type	The entire sample		Two-parent family		Single-parent family	
	GMA (n = 110)	GSAD (n = 47)	GMA (n = 72)	GSAD (n = 28)	GMA (n = 33)	GSAD (n = 18)
Melancholic	63.6 %*	38.3 %*	65.3 %*	32.1 %*	54.5 %	44.4 %
Sanguine	4.5 %	4.3 %	5.6 %		3.0 %	11.1 %
Phlegmatic	17.3 %*	42.6 %*	13.9 %*	60.7 %*	27.3 %	16.7 %
Choleric	14.5 %	14.9 %	15.3 %	7.1 %	15.2 %	27.8 %
<i>p</i>	0.007		0.000		0.387	
Cramer's coefficient	0.279		0.479			
γ -coefficient	0.349		0.412			

As Tab. 10 shows, there were differences between the groups in terms of type of temperament only among people from two-parent families. The proportion of the melancholics in the GMA group was significantly greater than in the GSAD group (65.3 and 32.1 %, respectively), and the proportion of the phlegmatics in the IULMS group was greater (60.7 % vs 13.9 %).

When studying the indicator “neuroticism”, certain correlations were established depending on child-rearing conditions (Tab. 11).

Table 11. “Neuroticism” indicator depending on the child-rearing conditions and the study groups

“Neuroticism indicator”	The entire sample		Two-parent family		Single-parent family	
	GMA (n = 111)	GSAD (n = 47)	GMA (n = 73)	GSAD (n = 28)	GMA (n = 33)	GSAD (n = 18)
0–12	21.6 %*	40.4 %*	19.2 %*	53.6 %*	30.3 %	22.2 %
13–18	38.7 %	38.3 %	39.7 %	28.6 %	36.4 %	50.0 %
19–24	39.6 %*	21.3 %*	41.1 %*	17.9 %*	33.3 %	27.8 %
Mean value	16.0*	14.0*	16.0*	12.5*	15.4	16.1
<i>p</i>	0.023		0.002		0.632	
Cramer's coefficient	0.219		0.347			
γ -coefficient	0.379		0.550			

Among those raised in the GSAD a two-parent family, the index of “neuroticism” was lower than in the PCA group, which agrees with the ratio of the phlegmatics in the GSAD and GMA raised in a two-parent family (60.7 and 13.9 %, respectively) (Tab. 12, 13).

In GSAD, individuals raised in a two-parent family had a lower level of “excitability” than those raised in a single-parent family (Tab. 12).

Among those raised in a two-parent GSAD family, the “excitability” level was lower than in the GMA group. The significance of this relationship determines the significance of the differences across the sample as a whole.

Table 12. “Excitability” indicator depending on the group membership and the child-rearing conditions

“Excitability” indicator	The entire sample		GMA		GSAD	
	Two-parent family (n = 100)	Single-parent family (n = 52)	Two-parent family (n = 73)	Single-parent family (n = 33)	Two-parent family (n = 27)	Single-parent family (n = 18)
0–12	55.0 %	42.3 %	46.6 %	38.2 %	77.8 %	50.0 %
13–18	26.0 %	32.7 %	28.8 %	38.2 %	18.5 %	22.2 %
19–24	19.0 %	25.0 %	24.7 %	23.5 %	3.7 %*	27.8 %*
Mean value	13.1	13.8	14.4	13.9	9.4*	13.7*
<i>p</i>	0.330		0.596		0.049	
Cramer’s coefficient					0.366	
γ -coefficient					0.356	

Table 13. Expression of “excitability” indicator depending on the upbringing features and the study groups

“Excitability” indicator	The entire sample		Two-parent family		Single-parent family	
	GMA (n = 112)	GSAD (n = 46)	GMA (n = 73)	GSAD (n = 27)	GMA (n = 34)	GSAD (n = 18)
0–12	43.8 %*	67.4 %*	46.6 %*	77.8 %*	38.2 %	50.0 %
13–18	31.3 %	19.6 %	28.8 %	18.5 %	38.2 %	22.2 %
19–24	25.0 %	13.0 %	24.7 %*	3.7 %*	23.5 %	27.8 %
Mean value	14.3*	11.2*	14.4*	9.4*	13.9	13.7
<i>p</i>	0.025		0.012		0.498	
Cramer’s coefficient	0.216		0.297			
γ -coefficient	0.400		0.603			

When comparing the groups in terms of “ostentatiousness” significant differences were also obtained depending on the child-rearing conditions (Tab. 14). The GMA group scored lower “ostentatiousness” indicator than the GSAD group regardless of the child-rearing conditions.

Table 14. “Ostentatiousness” indicator depending on the child-rearing conditions

“Ostentatiousness” indicator	The entire sample		Two-parent family		Single-parent family	
	GMA (n = 112)	GSAD (n = 46)	GMA (n = 73)	GSAD (n = 27)	GMA (n = 34)	GSAD (n = 18)
0–12	83.9 %*	60.9 %*	83.6 %*	51.9 %*	85.3 %	72.2 %
13–18	13.4 %*	32.6 %*	13.7 %*	40.7 %*	11.8 %	22.2 %
19–24	2.7 %	6.5 %	2.7 %	7.4 %	2.9 %	5.6 %
Mean value	9.6*	11.8*	9.4*	12.2*	9.8	11.3
<i>p</i>	0.007		0.005		0.523	
Cramer’s coefficient	0.250		0.325			
γ -coefficient	0.520		0.621			

The proportion of individuals with low ostentatiousness in GMA scores (0–12) high for both two-parent and single-parent families, which determined the low mean value of the ostentatiousness score for the individuals in this group. The significance of differences with GSAD in the two-parent family category determined the statistical significance of differences across the sample as a whole.

Statistically significant differences on the indicator “hyperthymia” were found between the groups when taking into account the factor of child-rearing conditions (Tab. 15).

Among those raised in a two-parent family, there was a statistically significant prevalence of individuals with a lower level of hyperthymia in the GMA, in GSAD with a medium level of hyperthymia. The significance of the association between those from two-parent families also determined the significance across the sample

On the “dysthymia” indicator, a statistically significant difference was obtained depending on child-rearing conditions (Tab. 16, 17).

Table 15. “Hyperthymia” indicator depending on child-rearing conditions

“Hyperthymia” indicator	The entire sample		Two-parent family		Single-parent family	
	GMA (<i>n</i> = 112)	GSAD (<i>n</i> = 46)	GMA (<i>n</i> = 73)	GSAD (<i>n</i> = 27)	GMA (<i>n</i> = 34)	GSAD (<i>n</i> = 18)
0–12	69.6 %*	47.8 %*	72.6 %*	44.4 %*	61.8 %	50.0 %
13–18	18.8 %	30.4 %	17.8 %	25.9 %	23.5 %	38.9 %
19–24	11.6 %	21.7 %	9.6 %*	29.6 %*	14.7 %	11.1 %
Mean value	10.0*	13.6*	9.6*	14.0*	11.1	13.2
<i>p</i>	0.034		0.016		0.507	
Cramer’s coefficient	0.207		0.289			
γ -coefficient	0.382		0.513			

Table 16. “Dysthymia” indicator depending on the group membership and the child-rearing conditions

“Dysthymia” indicator	The entire sample		GMA		GSAD	
	Two-parent family (<i>n</i> = 100)	Single-parent family (<i>n</i> = 52)	Two-parent family (<i>n</i> = 73)	Single-parent family (<i>n</i> = 34)	Two-parent family (<i>n</i> = 27)	Single-parent family (<i>n</i> = 18)
0–12	56.0 %	57.7 %	49.3 %	52.9 %	74.1 %	66.7 %
13–18	28.0 %	25.0 %	28.8 %	32.4 %	25.9 %	11.1 %
19–24	16.0 %	17.3 %	21.9 %	14.7 %	0.0 %*	22.2 %*
Mean value	13.1	13.5	13.9	13.7	11.0	13.2
<i>p</i>	0.920		0.679		0.026	
Cramer’s coefficient					0.402	
γ -coefficient					0.476	

As Tab. 16 shows, high level of dysthymia in GSAD (19–24) is significantly more common among people from single-parent families than among those raised in two-parent families. The severity of “dysthymia” was lower for GSAD compared to GMA among those who were born and raised in two-parent families (Tab. 17).

Table 17. “Dysthymia” indicator depending on the child-rearing conditions

“Dysthymia” indicator	The entire sample		Two-parent family		Single-parent family	
	GMA (<i>n</i> = 112)	GSAD (<i>n</i> = 46)	GMA (<i>n</i> = 73)	GSAD (<i>n</i> = 27)	GMA (<i>n</i> = 34)	GSAD (<i>n</i> = 18)
0–12	50.0 %*	69.6 %*	49.3 %*	74.1 %*	52.9 %	66.7 %
13–18	29.5 %	21.7 %	28.8 %	25.9 %	32.4 %	11.1 %
19–24	20.5 %	8.7 %	21.9 %		14.7 %	22.2 %
Mean value	13.8	11.9	13.9*	11.0*	13.7	13.2
<i>p</i>	0.060		0.017		0.235	
Cramer’s coefficient	0.189		0.285			
γ -coefficient	0.376		0.543			

When assessing the “anxiety” indicator statistically significant differences depended on child-rearing conditions (Tab. 18).

Those raised in a two-parent family scored lower level of anxiety in the GSAD group than in the GMA group.

Results and discussion: statistically significant differences between the groups were mainly due to the presence of differences between individuals raised in two-parent families. These groups differed in phlegmatic type of temperament (prevailed in GSAD), character traits “excitability”, “dysthymia” and “hyperthymia”. The “excitability” and “dysthymia” indicators scored lower in the GSAD, and “hyperthymia” was average, in contrast to the GMA group where this indicator scored low and among whom

melancholics predominated. The low indicators of “excitability” and “dysthymia” for phlegmatic individuals showed low mobility of mental processes and experiences, and could be responsible for difficulties in adaptive reactions and raise difficulties in solving current problems in life, thus causing the formation of suicidal behavior.

Statistical analysis revealed that it was typical for GSAD individuals raised in two-parent families, in addition to the phlegmatic type of temperament, be punished in childhood, have a lower level of education (secondary education predominated). They scored lower “neuroticism”, “excitability”, “dysthymia” and “anxiety”. The “hyperthermia” indicator was average.

Table 18. Expression of “anxiety” indicator and depending on the upbringing characteristics and the study group

“Anxiety” indicator	The entire sample		Two-parent family		Single -parent family	
	GMA (<i>n</i> = 112)	GSAD (<i>n</i> = 46)	GMA (<i>n</i> = 73)	GSAD (<i>n</i> = 27)	GMA (<i>n</i> = 34)	GSAD (<i>n</i> = 18)
0–12	58.0 %	76.1 %	54.8 %*	81.5 %*	64.7 %	66.7 %
13–18	30.4 %	17.4 %	32.9 %	14.8 %	29.4 %	22.2 %
19–24	11.6 %	6.5 %	12.3 %	3.7 %	5.9 %	11.1 %
Mean value	11.7	9.7	12.3*	8.7*	10.5	11.0
<i>p</i>	0.102		0.049		0.722	
Cramer’s coefficient			0.245			
γ -coefficient			0.546			

Low scores of “neuroticism”, “excitability”, “dysthymia”, “anxiety” characterise the phlegmatic temperament. They associated with low ability to displace negative emotions that to be one of the factors contributing to the formation of suicidal behavior. It once more establishes the importance of the negative impact of stress traumatization of the child on adult mental health, which manifests itself in raising and formation of a variety of mental pathology (personality disorder, anxiety disorders, addictions, self-injurious behavior, etc.) [2].

Conclusions

1. Statistically significant differences between the groups under study were found on the following indicators: type of temperament, “excitability” and “dysthymia” and were put down to the presence of distinctions between individuals raised in two-parent families.

2. GSAD individuals raised in two-parent families were more often punished in childhood. They were characterized by the phlegmatic type of temperament, had a lower level of education, “neuroticism”, “excitability”, “dysthymia” and “anxiety” indicators.

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

References

- Antonova A. A., Bachilo E. V., Baryl’nik Yu. B. Risk factors for developing suicidal behavior. *Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal* [Saratov journal of medical scientific research], 2012, vol. 8, no. 2, pp. 403–409 (in Russian).
- Charmandari E., Kino T., Souvatzoglou E., Chrousos G. P. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Hormone Research in Paediatrics*, 2003, vol. 59, no. 4, pp. 161–179. <https://doi.org/10.1159/000069325>
- Grzhibovskii A. M. Analysis of ordinal data. *Ekologiya cheloveka* [Human ecology], 2008, no. 8, pp. 56–62 (in Russian).
- Davidovskii S. V., Ibragimova Zh. A., Skugarevskaya M. M., Leonov N. N., Kostyuk D. D. Analysis of social factors and individual psychological characteristics of persons who have committed parasuicide. *Psikhiatriya, psikhoterapiya i klinicheskaya psikhologiya* [Psychiatry, psychotherapy, medical psychology], 2020, vol. 11, no. 3, pp. 531–545 (in Russian).
- Tereshchenko O. V., Kurilovich N. V., Knyazeva E. I. *Multivariate statistical analysis of data in the social sciences*. Minsk, Belarusian State University, 2012. 239 p. (in Russian).

Information about the authors

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

Janna A. Ibragimova – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus), E-mail: lbmibgmu@mail.ru

Darya D. Kastsiuk – Student. Institute of Psychology of the University of Wrocław (Dawida, 1, 50-527, Wrocław, Poland). E-mail: kostyuk20001402@mail.ru

Nikolay N. Leonov – Ph. D. (Phys. and Math.), Leading Researcher. Institute of Sociology of the National Academy of Sciences of Belarus (1/2, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus) Email: nick.leonov@gmail.com

Yuri M. Mikitski – Head of Republican unitary production enterprise “Academpharm” (5/4, Akademik V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mikitski@mail.ru

Maryna M. Skuhareuskaya – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Leading Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: marims@tut.by

Andrey N. Tretyk – Head of the Department. Republican Research and Practice Mental Health Center (152, Dolginovsky tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus).

Vadim V. Kuzhal – psychiatrist-narcologist. Republican Research and Practice Mental Health Center (152, Dolginovsky tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: jmj8@mail.ru

Информация об авторах

Давидовский Сергей Владимирович – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: davidouski@yandex.ru

Ибрагимова Жанна Аркадьевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lbmibgmu@mail.ru

Костюк Дарья Дмитриевна – студентка. Институт психологии Вроцлавского государственного университета (Дэйдэ, 1, 50-527, г. Вроцлав, Польша). E-mail: kostyuk20001402@mail.ru

Леонов Николай Николаевич – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотрудник. Институт социологии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 1/2, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nick.leonov@gmail.com

Мицицкий Юрий Мечиславович – директор Республиканского производственного унитарного предприятия «Академфарм» НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/4, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mikitski@mail.ru

Скугаревская Марина Михайловна – д-р мед. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: marims@tut.by

Третьяк Андрей Николаевич – заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр психического здоровья (г. Минск, Долгиновский тракт, 152, 220053, г. Минск, Республика Беларусь).

Кужаль Вадим Викторович – врач психиатр-нарколог. Республиканский научно-практический центр психического здоровья (Долгиновский тракт, 152, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: jmj8@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616-006.04
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-244-251>

Поступила в редакцию 20.05.2020
Received 20.05.2020

Е. В. Гончарова¹, И. Г. Тарутин², М. Н. Петкевич¹

¹Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь
²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н. Н. Александрова, а/г Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДОЗИМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЛАНА ЛУЧЕВОГО ЛЕЧЕНИЯ ПРИ НЕЗАПЛАНИРОВАННОМ ИЗМЕНЕНИИ СХЕМЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

Аннотация. Изменение схемы фракционирования курса лучевой терапии (ЛТ) оказывает существенное влияние на результаты лечения пациентов с онкологическими заболеваниями. Пренебрежение этими изменениями может привести к недооблучению опухолевых клеток и, как следствие, к возникновению рецидивов у пациентов, проходящих курс ЛТ. Для учета эффективности поглощенной дозы излучения существуют радиобиологические модели, позволяющие прогнозировать контроль над ростом опухоли, а также оценивать уровень токсичности в нормальных тканях после традиционной ЛТ.

Цель работы – оценка эффективности поглощенной дозы при возникновении незапланированного изменения схемы фракционирования в курсе ЛТ и разработка алгоритма, позволяющего учесть перерывы в лучевом лечении.

В ходе исследовательской работы произведена теоретическая оценка эффективности дозы излучения в опухоли при возникновении незапланированного перерыва в схеме лечения онкологических пациентов, построена графическая зависимость эффективности дозы излучения от длительности незапланированного перерыва в лечении пациентов для наиболее распространенных онкологических локализаций, разработан алгоритм проведения процедур ЛТ, учитывающий отклонения от запланированной схемы фракционирования.

Ключевые слова: линейно-квадратичная модель, лучевая терапия, фракционирование, алгоритм, пролиферация, радиобиология, рак молочной железы, рак предстательной железы, опухоли головы и шеи

Для цитирования: Гончарова, Е. В. Количественная оценка дозиметрических параметров плана лучевого лечения при незапланированном изменении схемы фракционирования / Е. В. Гончарова, И. Г. Тарутин, М. Н. Петкевич // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 244–251. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-244-251>

Katsiaryna V. Hancharova¹, Igor G. Tarutin², Maksim N. Piatkevich¹

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus
²N. N. Alexandrov National Cancer Centre, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF DOSIMETRIC PARAMETERS OF THE RADIATION TREATMENT PLAN FOR UNPLANNED CHANGES IN THE FRACTIONATION SCHEME

Abstract. Changes in the fractionation scheme of the radiotherapy course have an impact on the results of treatment of cancer patients. If changes in the fractionation scheme are not taken into account, this leads to under-irradiation of tumor cells and a possible occurrence of subsequent relapses. There are radiobiological models in order to take into account the errors in the radiation dose delivered to the tumor. They allow predicting the tumor control, as well as the toxicity level in normal tissues after traditional RT.

The objective of the work is to assess the effectiveness of the absorbed dose in the event, if the fractionation scheme in the RT course changes, and to develop an algorithm that takes into account breaks between treatment sessions.

In the study, the effectiveness of the radiation dose delivered to the tumor due to a change in the total treatment time is assessed analytically, a graphical dependence of the radiation dose efficiency on the duration of the unplanned interruption in the treatment of patients is built for the most common oncological localizations, an algorithm for radiotherapy procedures taking into account deviations from the standard radiation treatment pattern is developed.

Keywords: linear-quadratic model, radiotherapy, fractionation, algorithm, proliferation, radiobiology, breast tumors, prostate tumors, head and neck tumors

For citation: Hancharova K. V., Tarutin I. G., Piatkevich M. N. Quantitative assessment of dosimetric parameters of the radiation treatment plan for unplanned changes in the fractionation scheme. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 244–251 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-244-251>

Введение. Облучение злокачественных образований осуществляется на радиотерапевтических аппаратах, которые представляют собой сложную конструкцию, состоящую из многочисленных электронных, механических, пневматических, гидравлических, оптических узлов и систем. Это связано с появлением новых высокотехнологичных методик облучения (IMRT, VMAT, Gating, SRS/SRT и др.) и возросшими в последние годы требованиями к качеству лучевого лечения. Несмотря на высокие эксплуатационно-технические характеристики радиотерапевтического оборудования, периодически происходит выход из строя отдельных его частей и элементов. Ремонт такого оборудования может осуществляться от нескольких часов или дней до нескольких месяцев. Независимо от периода простоя оборудования, в курсе лечения пациента могут возникать перерывы, которые влекут за собой нарушение схемы фракционирования.

При возникновении перерыва в лечении увеличивается и продолжительность курса лучевой терапии (ЛТ), что может повлиять на возможность осуществления контроля над опухолью. В отсутствие облучения рост опухолей происходит относительно медленно. Однако если радиационное лечение началось, то скорость репопуляции опухолевых клеток возрастает. При повреждении опухоли и ее сжатию во время лечения время удвоения опухолевых клеток может составлять меньше 7 дней [1]. С увеличением продолжительности лучевого лечения доставленной к опухоли дозы излучения становится недостаточно для достижения запланированного радиотерапевтического эффекта.

Цель работы – оценка качества лучевого лечения пациентов при возникновении незапланированного перерыва в курсе лучевой терапии из-за технических неполадок радиотерапевтического оборудования.

Режимы фракционирования. ЛТ имеет более чем 120-летнюю историю. В начале применения ЛТ (конец 1890-х годов) поверхностные раковые образования облучали одной или несколькими фракциями [2]. Спустя несколько лет фракционированное лечение было признано более эффективным с точки зрения противоопухолевого эффекта и снижения токсичности для нормальных тканей. Вскоре в качестве стандартной схемы лечения был принят режим фракционирования с разовой очаговой дозой (РОД) от 1,8–2 Гр ежедневными фракциями до суммарной очаговой дозы (СОД) 50–66 Гр за 5 недель и более.

Облучение в суточных дозах свыше 2 Гр за более короткий период времени, чем при стандартной схеме лечения, называется гипофракционной лучевой терапией (ГФЛТ) [3]. При увеличении РОД противоопухолевые эффекты усиливаются, однако это увеличивает риск развития осложнений в нормальных тканях (особенно в поздно реагирующих), что значительно перевешивает пользу от противоопухолевого эффекта. Однако умеренное повышение дозы за фракцию не влияет на риск возникновения поздних лучевых повреждений нормальных тканей в случае, если уменьшена СОД и интервал между фракциями составляет 24 ч.

В настоящее время ЛТ является эффективным и широко используемым методом лечения онкологических заболеваний. Являясь стандартным и обязательным компонентом комплексного лечения онкологических заболеваний, ЛТ снижает частоту локальных рецидивов и увеличивает продолжительность жизни пациентов [4–7]. Планирование ЛТ неразрывно связано с поиском баланса между необходимостью подведения к опухоли дозы излучения, достаточной для уничтожения опухоли, и опасностью превышения толерантной дозы для нормальных тканей и критических органов. Рациональная схема фракционирования облучения позволяет упростить решение данной задачи. Способность пациента перенести оптимальную программу лечения является важным фактором принятия решения о проведении ЛТ [8].

При лучевом лечении опухолей головы и шеи (ОГШ) могут использоваться: традиционный режим (РОД 2 Гр, СОД 66–70 Гр), гиперфракционирование (РОД 1,2 Гр по две фракции в день, СОД 81,6 Гр), ускоренный режим фракционирования (РОД от 1,2 Гр по две фракции в день на первичную опухоль и зоны регионарного метастазирования (большое поле) до 36 Гр, затем на 4-й и 5-й неделе – в первую фракцию РОД от 1,8 до 18 Гр за 10 фракций на эту же зону, во вторую фракцию в этот же день – локально на опухоль (буст) от 1,6 до 16 Гр за 10 фракций). Применение расщепленного курса (7–14-дневный интервал) осуществляется после дозы 40 Гр у пожилых, ослабленных пациентов или при наличии некупируемых лучевых реакций III–IV степени. После подведения к запланированному объему дозы облучения 40–50 Гр ЛТ продолжается

в дополнительной дозе 30–20 Гр с уменьшенных полей. Общая доза и общее время лечения должны строго соблюдаться.

Для дистанционного облучения рака предстательной железы (РПЖ) применяют тормозное излучение высокоэнергетических ускорителей (4–23 МВ) с использованием техники 3D, IMRT или VMAT. Тактика лечения с дозой лучевой терапии до 76–80 Гр различается в зависимости от принадлежности пациента к той или иной прогностической группе.

При раке молочной железы (РМЖ) проводится конформная ЛТ (3D), ЛТ с модуляцией интенсивности дозы излучения (IMRT). При левосторонней локализации опухолевого процесса возможно использование техники 4D планирования (с учетом фазы дыхания) при наличии соответствующего радиотерапевтического оборудования. Могут быть использованы следующие схемы ЛТ: РОД 2,66 Гр (16 фракций), СОД 42,56 Гр; РОД 1,8–2 Гр, СОД 45–50 Гр. Длительные перерывы в лечении должны быть исключены, максимальная задержка между лечебными циклами – не более 1 недели. Лечение назначается по стадиям. ГФЛТ эффективна при РМЖ после органосохраняющих операций [9].

Учет пролиферации опухоли. Курс ЛТ обычно разбивается на ежедневные сеансы облучения для учета терапевтического соотношения между увеличением контроля над опухолью и уменьшением повреждения нормальных тканей. Разделение общей дозы на множество фракций позволяет защитить нормальные ткани от сублетальных повреждений благодаря промежуткам между облучениями и клеточному перераспределению. В то же время при разделении на фракции клетки насыщаются кислородом и перераспределяются по фазам клеточного цикла, что увеличивает вероятность гибели опухоли.

Для оценки доз излучения, обуславливающих одинаковый биологический эффект (изоэффективные дозы), которые передаются пациенту в течение разного общего времени, можно воспользоваться следующим уравнением [1]:

$$EQD_{2,T} = EQD_{2,t} - (T-t)D_{prolif}$$

где $EQD_{2,T}$ – доза, доставленная с учетом перерыва; $EQD_{2,t}$ – запланированная доза, T – дни лечения с выходными и перерывами, t – дни лечения с выходными без перерывов, D_{prolif} – коэффициент пролиферации для данного вида опухоли.

Линейно-квадратичная радиобиологическая модель учитывает скорость восстановительных и пролиферативных процессов, которые оказывают влияние на результативность лучевого воздействия, но в настоящее время скорость и курсовое время репопуляции в нормальных тканях и опухолях недостаточно изучены, но это следует рассматривать как перспективы дальнейшего развития модели.

Анализ дозиметрических параметров планов лучевого лечения при незапланированном изменении режима фракционирования для наиболее распространенных онкологических локализаций. Злокачественные новообразования молочной железы у женщин и предстательной железы у мужчин представляют наиболее многочисленные группы по уровням заболеваемости и смертности населения в Республике Беларусь. За 2018 г. в стране было зарегистрировано 4713 случая РМЖ и 4877 случаев РПЖ [10]. Также Беларусь за счет достаточно быстрого роста заболеваемости вошла в группу стран с высоким риском развития злокачественных новообразований орофарингиальной зоны. За 2018 г. в стране было зарегистрировано 1756 случаев орофарингиального рака [10]. Структура заболеваемости мужского и женского населения Республики Беларусь злокачественными новообразованиями в 2018 г. приведена на рис. 1.

Исходя из приведенных статистических данных, авторами произведена оценка дозиметрических параметров планов лучевого лечения при незапланированном изменении схемы фракционирования злокачественных новообразований молочной и предстательной железы, а также орофарингиальной зоны как наиболее частых случаев онкологических патологий.

При возникновении перерывов в лечении доставленная к новообразованию доза излучения становится недостаточной, чтобы полностью взять опухоль под контроль. Для оценки эффективности дозы и учета перерывов в лечении использовали формулу для учета изменений общего времени лечения, приведенную выше.



Рис. 1. Статистика заболеваемости онкологией в РБ для мужчин и женщин за 2018 г. в процентном соотношении [10]

Fig. 1. Cancer statistic of the Belarus for men and women for 2018 in percentage terms [10]

Для расчета анализируемых показателей были взяты коэффициенты [11]:

при РМЖ: $D_{prolif} = 0,6$ Гр/день, $\alpha/\beta = 4$ Гр,

при РПЖ: $D_{prolif} = 0,24$ Гр/день,

при ОГШ (гортань): $D_{prolif} = 0,74$ Гр/день.

Результаты аналитических расчетов представлены на рис. 2.

Проведено сравнение между снижением эффективности дозы за счет перерыва в лечении и уменьшением дозы за фракцию, которое привело бы к такому же снижению эффективности дозы (см. таблицу).

Применение приведенного выше уравнения допустимо, если перерыв в лечении составляет 1–2 недели, но если он превышает 3 недели, то такая оценка снижения эффективности дозы излучения может оказаться некорректной [1]. При этом компенсацию перерыва необходимо рассматривать в связке с оценкой возможного риска осложнений от дозы излучения и облучаемого объема, основанных на выводах QUANTEC. Следует также отметить, что нами не приводятся данные, после какой по счету процедуры возникает вынужденный перерыв в лечении. Наибольшее значение имеют перерывы, которые приходится на вторую половину курса ЛТ.

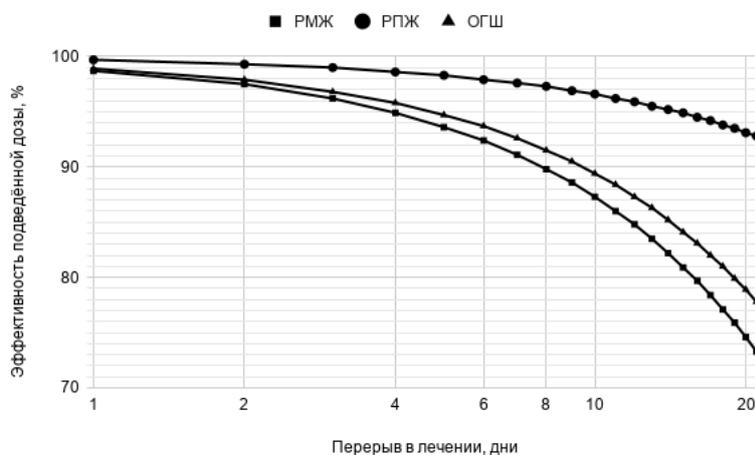


Рис. 2. Аналитически рассчитанные параметры эффективности дозы при возникновении перерывов в курсе ЛТ для РМЖ, РПЖ, ОГШ

Fig. 2. Analytically calculated parameters of the dose-effectiveness in the tumor during interruptions in the course of radiotherapy for breast, prostate, and oropharyngeal cancer

Снижение дозы за фракцию δ для различных перерывов между сеансами ЛТ, %
Dose reduction per fraction δ for different breaks between the RT sessions, %

Снижение дозы за фракцию δ , %	Перерыв в лечении, дни										
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
ОГШ	0,94	2,84	4,74	6,65	8,57	10,49	12,42	14,37	16,32	18,28	20,24
РМЖ	0,91	2,75	4,6	6,48	8,37	10,29	12,23	14,19	16,18	18,19	20,23
РПЖ	0,24	0,72	1,21	1,69	2,18	2,67	3,16	3,65	4,14	4,63	5,13

Алгоритм проведения процедур лучевой терапии, учитывающий отклонения от режима фракционирования. Проведение корректного лучевого лечения онкологическим пациентам предполагает сведение к минимуму погрешностей, которые влияют на точность воспроизведения запланированных условий ЛТ. Непосредственное влияние на точность реализации схемы запланированного лечения оказывают непредвиденные перерывы между сеансами ЛТ, возникающие из-за остановок радиотерапевтического оборудования вследствие его неисправности. Чаще всего причинами отклонения от схемы лечения являются перерывы от 1 до 3 дней, реже – перерывы от 4 до 7 дней, связанные с поломкой радиотерапевтического оборудования. Однако на практике могут возникать ситуации, когда перерыв превышает 7 дней в связи с плохой пере-

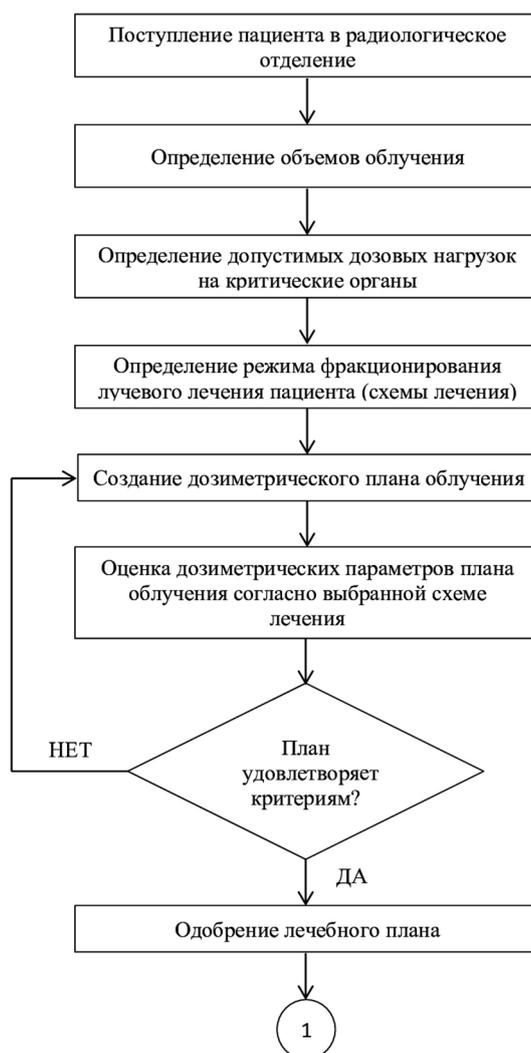


Рис. 3. Алгоритм планирования лучевого лечения

Fig. 3. Radiation treatment algorithm

носимостью пациентом лучевого лечения. Такие случаи имеют место при ослабленном иммунитете пациента или активно развивающихся сопутствующих заболеваниях. Перерывы, протяженность которых превышает 1 неделю, значительно ухудшают показатели локального контроля над опухолью и общей выживаемости пациентов [12]. Для оптимизации последовательности действий специалистов радиологических отделений в случаях непредвиденных остановок радиотерапевтического оборудования авторами предлагается алгоритм сеанса лучевой терапии, учитывающий отклонения от схемы лучевого лечения (рис. 3, 4).

На этапе предлучевой подготовки пациента к лучевому лечению радиационный онколог определяет объемы облучения, допустимые дозовые нагрузки на критические органы и режим фракционирования дозы излучения (традиционный режим, гиперфракционирование, варианты ускоренного фракционирования и др.). Далее медицинским физиком производится расчет дозиметрического плана облучения исходя из предписаний радиационного онколога. На следующем этапе предлучевой подготовки проводится оценка дозиметрических параметров плана облучения, и в случае, если план удовлетворяет заданным условиям, его одобряет заведующий радио-

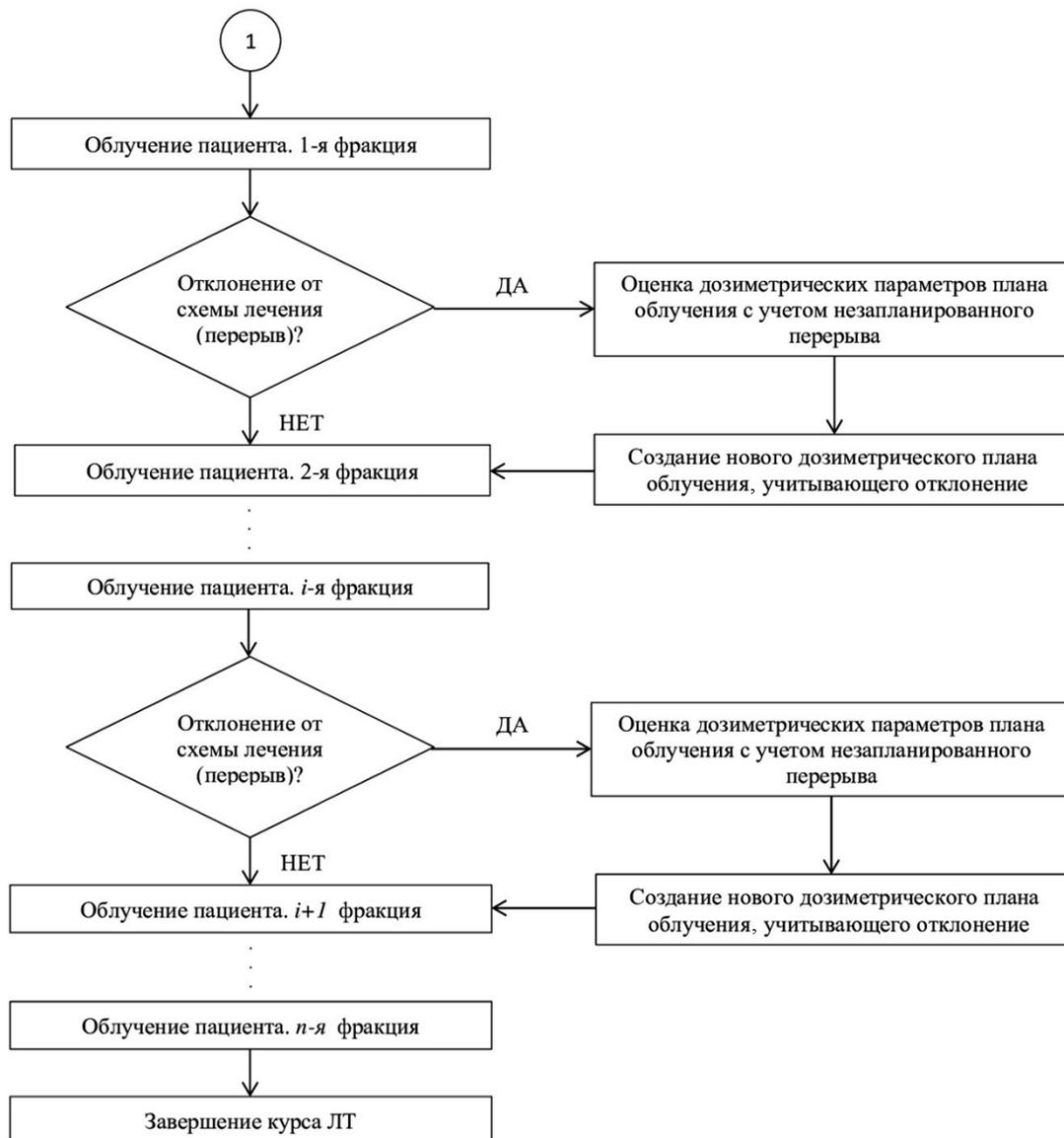


Рис. 4. Алгоритм сеанса лучевой терапии, учитывающий отклонения от стандартной схемы лучевого лечения
 Fig. 4. Radiotherapy session algorithm taking into account the deviation from the standard radiation treatment pattern

логическим отделением. В случае, если план не удовлетворяет критериям оценки, план отправляется на перепланирование или доработку (см. рис. 3).

После одобрения лечебного плана пациент начинает курс ЛТ на радиотерапевтическом аппарате. Согласно запланированному лечению, пациент должен пройти все сеансы ЛТ по установленной схеме лечения. В случаях, когда возникает перерыв в лечении пациента, медицинским физиком производится перерасчет плана облучения, в котором учитывается отклонение от запланированной схемы лечения. После проведения пациенту всех сеансов лучевого лечения курс ЛТ завершается (рис. 4).

Заключение. В ходе исследования произведена аналитическая оценка эффективности подведенной к опухоли дозы в связи с возникновением перерывов в курсе ЛТ с учетом пролиферации опухоли; рассчитано, какой величине снижения δ разовой дозы соответствует лечение без учета возникших в ходе лечения перерывов. Показана зависимость величины погрешности дозы излучения от длительности перерыва в лучевом лечении для опухолей головы и шеи (гортани), молочной и предстательной желез, разработан алгоритм проведения процедур ЛТ, учитывающий отклонения от стандартной схемы лучевого лечения.

Согласно результатам аналитического расчета, в случае увеличения длительности курса ЛТ на неделю за счет возникших в лечении перерывов эффективность подведенной к опухоли дозы излучения может уменьшаться: для РМЖ и ОГШ – со 100 до 92 %, для РПЖ – со 100 до 97 %. Падение эффективности подведенной к опухоли дозы излучения может привести к снижению показателей локального контроля над опухолью, увеличению вероятности возникновения рецидивов и уменьшению общей выживаемости пациентов. Поэтому перерывам в лечении следует уделять особое внимание и делать все возможное, чтобы их избежать. В случаях, когда это невозможно, необходимо скорректировать схему лечения таким образом, чтобы максимально приблизить ее к запланированной.

В работе рассмотрены только некоторые аспекты проблем, вызванных незапланированными перерывами в курсе лучевой терапии. Для выбора обоснованной корректировки схемы лечения необходим ее анализ с целью оценки дозы излучения в опухоли и окружающих нормальных тканях при определенных изменениях в курсе ЛТ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Климанов, В. А. Радиобиологическое и дозиметрическое планирование лучевой и радионуклидной терапии : в 2 ч. / В. А. Климанов. – М. : НИЯУ МИФИ, 2011. – Ч. 1. – 500 с.
2. An overview on radiotherapy: from its history to its current applications in dermatology / S. Gianfaldoni [et al.] // Open Access Maced. J. Med. Sci. – 2017. – Vol. 5, N 4. – P. 521–525. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.122>
3. Hypofractionated radiotherapy after conservative surgery for breast cancer: analysis of acute and late toxicity / L. Deantonio [et al.] // Radiat. Oncol. – 2010. – Vol. 5, N 1. – P. 112. <https://doi.org/10.1186/1748-717x-5-112>
4. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomized trials / S. Darby [et al.] // Lancet. – 2011. – Vol. 378, N 9804. – P. 1707–1716. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61629-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61629-2)
5. Hypofractionated whole breast irradiation: new standard in early breast cancer after breast-conserving surgery / Kyung Su Kim [et al.] // Radiat. Oncol. J. – 2016. – Vol. 34, N 2. – P. 81–87. <https://doi.org/10.3857/roj.2016.01697>
6. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomized trials / P. McGale [et al.] // Lancet. – 2014. – Vol. 383, N 9935. – P. 2127–2135. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60488-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60488-8)
7. Speers, C. Postoperative radiotherapy after breast-conserving surgery for early-stage breast cancer / C. Speers, L. J. Pierce // JAMA Oncol. – 2016. – Vol. 2, N 8. – P. 1075. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.5805>
8. Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований : клин. протокол / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. – Минск : Проф. изд., 2019. – 616 с.
9. Гипофракционированные режимы лучевой терапии после органосохраняющих операций по поводу рака молочной железы I–IIa стадий / Ю. В. Ефимкина [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2011. – Т. 3. – С. 45–53.
10. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцер-регистра за 2009–2018 гг. / А. Е. Океанов [и др.] ; отв. ред. Т. Б. Ипаций. – Минск : Нац. б-ка Беларуси, 2019. – 422 с.
11. Basic clinical radiobiology / eds. : M. C. Joiner, A. J. van der Kogel. – 5th ed. – Boca Raton : CRC Press, 2018. – 360 p.
12. Афонин, Г. В. Ускоренные режимы адьювантной лучевой терапии в лечении рака молочной железы / Г. В. Афонин, Ю. А. Рагулин, И. А. Гулидов // Исслед. и практика в медицине. – 2017. – Т. 4, № 3. – С. 66–74.

References

1. Klimanov V. A. *Radiobiological and dosimetric planning of radiation and radionuclide therapy. Part 1*. Moscow, National Research Nuclear University MEPhI, 2011, p. 500 (in Russian).
2. Gianfaldoni S., Gianfaldoni R., Wollina U., Lotti J., Tchernev G., Lotti T. An overview on radiotherapy: from its history to its current applications in dermatology. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2017, vol. 5, no. 4, pp. 521–525. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.122>
3. Deantonio L., Gambaro G., Beldi D., Masini L., Tunesi S., Magnani C., Krengli M. Hypofractionated radiotherapy after conservative surgery for breast cancer: analysis of acute and late toxicity. *Radiation Oncology*, 2010, vol. 5, no. 1, p. 112. <https://doi.org/10.1186/1748-717x-5-112>
4. Darby S., McGale P., Correa C., Taylor C., Arriagada R., Clarke M. [et al.]. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomized trials. *Lancet*, 2011, vol. 378, no. 9804, pp. 1707–1716. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61629-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61629-2)
5. Kim K. S., Shin K. H., Choi N., Lee S.-W. Hypofractionated whole breast irradiation: new standard in early breast cancer after breast-conserving surgery. *Radiation Oncology Journal*, 2016, vol. 34, no. 2, pp. 81–87. <https://doi.org/10.3857/roj.2016.01697>
6. McGale P., Taylor C., Correa C., Cutter D., Duane F., Ewertz M. [et al.]. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomized trials. *Lancet*, 2014, vol. 383, no. 9935, pp. 2127–2135. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60488-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60488-8)
7. Speers C., Pierce L.J. Postoperative radiotherapy after breast-conserving surgery for early-stage breast cancer. *JAMA Oncology*, 2016, vol. 2, no. 8, p. 1075. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.5805>
8. *Algorithms for the diagnosis and treatment of malignant neoplasms: a clinical protocol*. Minsk, Professional'nye izdaniya Publ., 2019. 616 p. (in Russian).
9. Efimkina Yu. V., Gladilina I. A., Nechushkin M. I., Kozlov O. V. Hypofractionated radiotherapy regimens after organ-sparing surgery for stages I–IIa breast cancer. *Opukholi zhenskoi reprodukativnoi sistemy* [Tumors of female reproductive system], 2011, vol. 3, pp. 45–53 (in Russian).
10. Okeanov A. E., Moiseev P. I., Levin L. F., Evmenenko A. A., Ipatii T. B. *Cancer in Belarus: figures and facts. Analysis of the data of the Belarusian Cancer Register for 2009–2018*. Minsk, State Institution “National Library of Belarus”, 2019, p. 422 (in Russian).
11. Joiner M. C., van der Kogel A. J. (eds.). *Basic clinical radiobiology. 5th ed.* Boca Raton, CRC Press, 2018. 360 p.
12. Afonin G. V., Ragulin Yu. A., Gulidov I. A. Accelerated regimens of adjuvant radiotherapy in the treatment of breast cancer. *Issledovaniya i praktika v meditsine* [Research and practice in medicine], 2017, vol. 4, no. 3, pp. 66–74 (in Russian).

Информация об авторах

Гончарова Екатерина Викторовна – аспирант. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: katsiaryna.hancharova@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-4383-2360>

Тарутин Игорь Германович – д-р техн. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, а/г Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-4115-1326>

Петкевич Максим Николаевич – аспирант. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Katsiaryna V. Hancharova – Postgraduate student. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: katsiaryna.hancharova@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-4383-2360>

Igor G. Tarutin – D. Sc. (Engineering), Professor, Chief Researcher. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-4115-1326>

Maksim N. Piatkevich – Postgraduate student. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus).

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.428-079:616.9-053.2

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-252-256>

Поступила в редакцию 18.01.2021

Received 18.01.2021

Р. Ф. Махмутов

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, Украина

ЛИМФАДЕНОПАТИЯ КАК МАРКЕР ПЕРВИЧНОЙ ФОРМЫ ЭПШТЕЙНА–БАРР ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, РЕКУРРЕНТНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

Аннотация. Лимфаденопатия (ЛП) у детей – одно из основных проявлений явного или скрытого инфекционного процесса при вирусных заболеваниях. При дифференциальной диагностике этих заболеваний она может рассматриваться в качестве одного из ведущих маркеров.

Цель исследования – определить значимость лимфаденопатии при дифференциальной диагностике первичной формы Эпштейна–Барр вирусной инфекции, рекуррентных респираторных заболеваний и аденовирусной инфекции у детей и подростков.

Обследовано 336 детей и подростков в возрасте от 7 до 17 лет включительно с вирусными инфекциями и ЛП: 93 пациента с первичной формой Эпштейна–Барр вирусной инфекции (ЭБВИ), 167 пациентов с рекуррентными респираторными заболеваниями (РРЗ), 76 пациентов с тонзиллярной формой аденовирусной инфекции (АДВИ), которым проводили ультразвуковое исследование подчелюстных, передне- и заднешейных, паховых и мезентериальных лимфатических узлов.

ЛП различной локализации была выявлена у всех пациентов с первичной формой ЭБВИ, РРЗ и АДВИ. Детальный анализ топографических особенностей ЛП в плане сроков ее регресса показал, что у детей и подростков с первичной формой ЭБВИ заболевание начиналось с одновременного увеличения лимфатических узлов всех групп, причем увеличение заднешейных и подчелюстных лимфатических узлов не соответствовало объективному состоянию поражения ротоглотки. При РРЗ наиболее часто наблюдалась ЛП шейной области, а при АДВИ – умеренная генерализованная ЛП.

Для ЛП при ЭБВИ характерен преимущественно крупный диаметр ($2,7 \pm 0,06$ см) лимфатических узлов, тогда как при РРЗ и АДВИ преобладали лимфатические узлы мелкого ($0,5 \pm 0,03$ см) и среднего ($0,6 \pm 0,1$ см) диаметра. Морфологические изменения в лимфатических узлах при ЛП при первичной форме ЭБВИ, РРЗ, а также АДВИ проявлялись в виде неоднородной структуры и различной эхогенности стромы, что может служить маркером на этапах ранней и дифференциальной диагностики перечисленных вирусных инфекций.

Ключевые слова: лимфаденопатия, дифференциальная диагностика, вирусные инфекции, дети

Для цитирования: Махмутов, Р. Ф. Лимфаденопатия как маркер первичной формы Эпштейна–Барр вирусной инфекции, рекуррентных респираторных заболеваний и аденовирусной инфекции у детей / Р. Ф. Махмутов // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 252–256. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-252-256>

Ravil F. Makhmutov

M. Gorki Donetsk National Medical University, Donetsk, Ukraine

LYMPHADENOPATHY AS A MARKER OF THE PRIMARY FORM OF EPSTEIN-BARR OF VIRAL INFECTION, RECURRENT RESPIRATORY DISEASES AND ADENOVIRUS INFECTION IN CHILDREN

Abstract. Lymphadenopathy is one of the leading manifestations of an overt or latent infectious process in viral diseases, and in their differential diagnosis of diseases it is considered as one of the leading markers.

Objective – to determine the importance of lymphadenopathy in the differential diagnosis of the primary form of the Epstein-Barr viral infection, recurrent respiratory diseases and adenovirus infection in children and adolescents.

336 children and adolescents aged 7 to 17 years inclusive with viral infections and lymphadenopathy were examined: 93 patients with the primary form of Epstein-Barr viral infection (EBVI), 167 patients with recurrent respiratory diseases (RRD), 76 patients with tonsillar adenoviral infections (ADVI), which underwent ultrasound examination of the submandibular, anterior and posterior cervical, inguinal and mesenteric lymph nodes.

Lymphadenopathy of various localization was detected in all patients with the primary form of EBVI, RRD and ADVI. A detailed analysis of the topographic features of lymphadenopathy in the context of the timing of its regression showed that in children and adolescents with the primary form of EBVI, the disease began with a simultaneous enlargement of the lymph nodes of all groups, and the increase in the posterior cervical and submandibular lymph nodes did not correspond to the objective state of the oropharyngeal lesion. In RRD, lymphadenopathy of the cervical region was most often observed, and in ADVI, moderate generalized lymphadenopathy was observed.

Lymphadenopathy in EBVI is generally characterized by a large diameter (2.7 ± 0.06 cm) of the lymph nodes; whereas in RRD and ADVI, lymph nodes of small (0.5 ± 0.03 cm) and medium (0.6 ± 0.1 cm) diameters prevailed. Morphological changes in the lymph nodes in lymphadenopathy in the primary form of Epstein-Barr viral infection, recurrent respiratory

diseases and adenovirus infection are manifested by a heterogeneous structure and different echogenicity of the stroma, which can be taken into account as a marker at the stages of early and differential diagnosis of the listed viral infections.

Keywords: lymphadenopathy, differential diagnosis, viral infections, children

For citation: Makhmutov R. F. Lymphadenopathy as a marker of the primary form of Epstein-Barr of viral infection, recurrent respiratory diseases and adenovirus infection in children. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 252–256 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-252-256>

Введение. Известно, что лимфатические узлы, являясь периферическими органами иммунной системы, выполняют барьерную функцию по отношению к проникающим в организм патогенным агентам. Однако в силу ряда причин эта барьерная функция может нарушаться, что приводит к развитию воспалительного процесса в лимфатических узлах [1–3].

Поражение лимфатических узлов, в том числе увеличение их размеров, возникает вследствие как иммунной реакции на антигенную агрессию, так и местной воспалительной реакции на инфекционный агент [2, 4–7].

Таким образом, ввиду вовлеченности лимфатической системы в воспалительный процесс в организме именно лимфатические узлы непосредственно реагируют на воспаление.

Лимфаденопатия (ЛП) как одно из ведущих проявлений явного или скрытого инфекционного процесса является одним из наиболее частых симптомов при многих заболеваниях [4, 6, 8]. Однако при дифференциальной диагностике вирусных заболеваний у детей ЛП может рассматриваться в качестве одного из ведущих маркеров, что подчеркивает диагностическую ценность данного симптома [3–5, 9, 10].

Цель данного исследования – определить значимость лимфаденопатии при дифференциальной диагностике первичной формы Эпштейна–Барр вирусной инфекции, рекуррентных респираторных заболеваний и аденовирусной инфекции у детей и подростков.

Объекты и методы исследования. Обследовано 336 детей и подростков в возрасте от 7 до 17 лет включительно с вирусными инфекциями и ЛП: 93 пациента с первичной формой Эпштейна–Барр вирусной инфекции (ЭБВИ), 167 пациентов с рекуррентными респираторными заболеваниями (РРЗ), 76 пациентов с аденовирусной инфекцией (АДВИ). Средний возраст пациентов на начало исследования составил $12,7 \pm 4,9$ года, причем детей в возрасте 7–11 лет было 242, подростков (12–17 лет) – 94.

Критерии включения в исследование: возраст 7–17 лет, первичная форма ЭБВИ, РРЗ, АДВИ, наличие ЛП.

Критерии исключения: дети и подростки с инфекционными заболеваниями с лимфопролиферативным синдромом; отказ родителей или законных представителей от участия в исследовании.

Изучены анамнестические данные, выписки из историй болезни, консультативные заключения узких специалистов (врачей-педиатров, детских хирургов, отоларингологов, иммунологов), результаты клинико-лабораторных и функциональных исследований, на основании чего выставляли диагноз в соответствии с «МКБ 10-го пересмотра».

Всем юным пациентам с вирусными инфекциями проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) подчелюстных, передне- и заднешейных, паховых и мезентериальных лимфатических узлов, используя линейный мультислотный датчик с режимом развернутой апертуры. Сканирование выполняли в трех взаимно перпендикулярных плоскостях (УЗ диагностическая система «ДР-6600», фирма-производитель Mindray, Китай). Определяли количество, топографоанатомические и качественные характеристики увеличенных лимфатических узлов, а также изменения структуры стромы, экзогенность окружающих тканей, наличие некроза и выраженность кровотока в них.

Родители или законные представители пациентов были информированы о целях, характере исследования, диагностических процедурах и дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с помощью вариационного, непараметрического, дисперсионного анализа (пакеты анализа Microsoft Excel и Statistica-Stat-Soft). Оценивали нормальность распределения (тест Шапиро–Уилка), вычисляли средние значения, абсолютную и относительную частоту признаков, использовали критерии Стьюдента, углового преобразования Фишера, χ^2 .

Результаты и их обсуждение. УЗИ лимфатических узлов у детей сравниваемых групп показало наличие ЛП различной локализации у всех пациентов с первичной формой ЭБВИ, РРЗ

и АДВИ. При этом изучаемые формы вирусных инфекций имели определенные особенности в отношении количества, комбинации и топографоанатомических характеристик увеличенных лимфатических узлов (см. таблицу). Отдельное внимание при УЗИ лимфатических узлов уделялось изучению их структуры и размеров. Согласно условной градации и с учетом возраста юных пациентов, диаметр мелких лимфатических узлов не превышал 0,5 см, средних – 0,6–1,0, крупных – 1,2–1,5 см.

Сравнительный анализ размеров лимфатических узлов при изучаемых формах вирусных инфекций показал увеличение диаметра лимфатических узлов шейной области при первичной форме ЭБВИ до $2,2 \pm 0,7$ см в течение $3,4 \pm 0,8$ недели; при РРЗ в периоде обострения – до $1,4 \pm 0,4$ см за $2,5 \pm 0,5$ недели; при АДВИ – до $1,3 \pm 0,3$ см в течение $2,2 \pm 0,5$ недели. Таким образом, увеличение лимфатических узлов шейной области имело более выраженный характер у детей при ЭБВИ, нежели при РРЗ или АДВИ – на 60 и на 70 % соответственно ($p < 0,05$), а длительность восстановления лимфатических узлов до нормальных размеров превосходила аналогичные параметры на 30 и 40 % соответственно ($p < 0,05$).

Важно отметить, что если при первичной форме ЭБВИ мелкие лимфатические узлы ($0,5 \pm 0,02$ см) наблюдались у 16 (17,2 %) пациентов раннего возраста, а средние ($0,7 \pm 0,01$ см) – у 11 (11,8 %) детей младшей возрастной группы, то крупные лимфатические узлы ($2,7 \pm 0,06$ см) выявлены у 66 (71,0 %) детей и подростков, т. е. в подавляющем большинстве случаев.

При РРЗ характер распределения размеров лимфатических узлов шейной области был иным: в подавляющем большинстве случаев мелкие ($0,4 \pm 0,01$ см) и средние ($0,8 \pm 0,03$ см) лимфатические узлы наблюдались у юных пациентов (у 72 (43,1 %) детей дошкольного возраста и у 85 (50,9 %) детей школьного возраста соответственно), тогда как крупные лимфатические узлы ($1,2 \pm 0,05$ см) – лишь у 10 (6,0 %) подростков. При АДВИ наблюдалась аналогичная РРЗ тенденция: если мелкие лимфатические узлы ($0,5 \pm 0,03$ см) выявлялись у каждого второго ребенка дошкольного возраста (42 (55,3 %)), а средние ($0,6 \pm 0,1$ см) – у 29 (38,2 %) детей, то крупные ($1,5 \pm 0,05$ см) – лишь у 5 (6,6 %) подростков.

Детальный анализ топографических особенностей ЛП в плане сроков ее регресса показал следующие особенности, характерные для каждой изучаемой формы вирусных инфекций у детей и подростков. Так, при том, что у детей и подростков с первичной формой ЭБВИ заболевание начиналось с одновременного увеличения лимфатических узлов всех групп, наиболее характерным было формирование «цепочки» или «пакета» размером $2,9 \pm 1,3$ см в диаметре из увеличенных лимфатических узлов по заднему краю грудно-сосковой мышцы. Выявленные «цепочки» были множественными, безболезненными, плотновато-эластической консистенции. В наблюдаемых случаях узлы не были спаяны между собой и лишь изредка, преимущественно у детей дошкольного и младшего школьного возраста, наблюдались конгломераты, которые изменяли конфигурацию шеи и производили впечатление отека. Динамическое наблюдение свидетельствовало о чрезвычайно медленном их обратном развитии до нормальных размеров (в течение $4,7 \pm 1,8$ недели).

Что касается переднешейных лимфатических узлов, то при ЭБВИ они располагались симметрично с обеих сторон, достигая $2,3 \pm 0,8$ см в диаметре, были средней плотности, как правило, умеренно болезненными и не спаянными между собой. В то же время увеличение подчелюстных лимфатических узлов при множественном характере было не столь выражено ни в плане частоты и размеров (не превышали $1,5 \pm 0,4$ см в диаметре), ни в плане болезненности. При этом если их обратное развитие не затягивалось, то происходило синхронно с исчезновением признаков заболевания.

Кроме того, у юных пациентов с ЭБВИ в первые дни болезни наблюдалось постепенное увеличение до $2,5 \pm 0,9$ см паховых лимфатических узлов с обеих сторон, которые достигали максимального диаметра через $7,2 \pm 0,8$ сут болезни и регрессировали в течение $5,1 \pm 0,3$ недели.

В результате гиперплазии лимфоидной ткани в ответ на вирусемию возникала полиадения, что является одним из наиболее ранних признаков и характерной особенностью первичной формы ЭБВИ. Генерализованное увеличение лимфатических узлов, как первый симптом ЭБВИ, наблюдалось у 65 (69,9 %) детей и подростков, при этом максимальные их размеры обнаруживались лишь спустя $6,9 \pm 1,7$ дня от начала болезни. В каждом третьем случае (28 (30,1 %)) при одновременном увеличении лимфатических узлов разных групп наиболее выражено были увели-

чены заднешейные лимфатические узлы, причем какая-либо определенная последовательность отсутствовала. У каждого десятого юного пациента (9 (9,7 %)) вокруг увеличенных лимфатических узлов отмечалась пастозность клетчатки.

Кроме того, в каждом втором случае (49 (52,7 %)) при ЭБВИ увеличение размеров шейной группы лимфатических узлов не соответствовало признакам поражения ротоглотки. Так, в каждом пятом случае (22 (23,7 %)) отмечалось значительное увеличение заднешейных и подчелюстных лимфатических узлов при катаральном характере воспаления ротоглотки, тогда как при массивных налетах на миндалинах лимфатические узлы были увеличены умеренно у каждого третьего пациента (27 (29,0 %)).

Таким образом, у всех детей и подростков с ЭБВИ наблюдаемое увеличение заднешейных и подчелюстных лимфатических узлов не соответствовало объективному состоянию поражения ротоглотки.

Топографические особенности лимфаденопатии при изучаемых формах вирусных инфекций у детей и подростков (M ± m)

Topographic features of lymphadenopathy in the studied forms of viral infections in children and adolescents (M ± m)

Показатели топографии лимфатических узлов	ЭБВИ (n = 93)		РРЗ (n = 167)		АДВИ (n = 76)	
	Диаметр, см	Длительность, недели	Диаметр, см	Длительность, недели	Диаметр, см	Длительность, недели
Подчелюстные	1,5 ± 0,4	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,3	2,3 ± 0,6	1,6 ± 0,1	2,2 ± 0,5
Переднешейные	2,3 ± 0,8	3,4 ± 0,5	1,9 ± 0,7 ^э	2,5 ± 0,5 ^э	1,1 ± 0,3 ^э	2,4 ± 0,7 ^э
Заднешейные	2,9 ± 1,3	4,7 ± 1,8	0,8 ± 0,4 ^э	2,7 ± 0,1 ^э	1,3 ± 0,5 ^э	2,1 ± 0,3 ^{э,р}
Паховые	2,5 ± 0,9	5,3 ± 0,8	–	–	–	–
Мезентериальные	1,1 ± 0,2	3,2 ± 0,4	–	–	–	–
Генерализованная ЛП	2,2 ± 0,7	4,3 ± 0,4	–	–	1,7 ± 0,2	2,4 ± 0,6 ^э

Примечание. Достоверно значимые отличия ($p < 0,05$): ^э – от показателей группы ЭБВИ, ^р – от показателей группы РРЗ.

Детальный анализ результатов УЗИ лимфатических узлов у юных пациентов с РРЗ позволил выявить следующие особенности. Так, в 59 (35,4 %) случаях – преимущественно у детей дошкольного возраста – наряду с развитием симптомокомплекса болезни наблюдалась ЛП шейной области в виде отека клетчатки и симметричного увеличения переднешейных средней плотности лимфатических узлов диаметром до $1,9 \pm 0,7$ см, не спаянных между собой. Увеличение заднешейных лимфатических узлов наблюдалось несколько реже, было менее выраженным ($0,8 \pm 0,4$ см) и, так же как в случае ЭБВИ, узлы были множественными, безболезненными и в течение $2,7 \pm 0,1$ недели регрессировали синхронно с исчезновением признаков болезни.

Для 76 детей с АДВИ была характерна умеренная генерализованная ЛП. Причем уже с первых дней болезни наблюдалось увеличение лимфатических узлов. Что касается их локализации, то наиболее часто это были заднешейные и подчелюстные лимфатические узлы, несколько реже – мезентериальные. При плотно-эластичной консистенции отмечалась легкая болезненность лимфатических узлов. В единичных (6 (7,9 %)) наблюдениях ЛП заднешейных лимфатических узлов была выражена вплоть до изменения конфигурации шеи, однако регресс наступал уже спустя $1,8 \pm 0,2$ недели.

При изучаемых формах вирусных инфекций у юных пациентов морфологические изменения в лимфатических узлах отражали наличие воспалительного процесса и характеризовались неоднородной структурой и различной экзогенностью стромы, что этиологически обусловлено и сигнализирует о неблагоприятном состоянии лимфатической системы.

Несмотря на выявленные различия у детей и подростков при первичной форме ЭБВИ, РРЗ и АДВИ, характер поражения лимфатических узлов во многом имел однотипные черты. Поскольку реакция лимфатических узлов на присутствие различных вирусных агентов в организме имеет неспецифический характер вне зависимости от этиологического фактора и не определяется тяжестью инфекционного процесса, ранняя диагностика болезни и ее дифференциация затруднена. Однако этиологическая обусловленность разной степени выраженности поражения делает возможной качественную диагностику первичной формы ЭБВИ, РРЗ и АДВИ у детей и подростков еще на ранних этапах.

Заключение. Таким образом, для ЛП при ЭБВИ характерным является преимущественно крупный диаметр ($2,7 \pm 0,06$ см) лимфатических узлов, тогда как при РРЗ и АДВИ преобладают лимфатические узлы мелкого ($0,5 \pm 0,03$ см) и среднего ($0,6 \pm 0,1$ см) диаметра.

Установлено, что морфологические изменения в лимфатических узлах при ЛП при первичной форме ЭБВИ, РРЗ, а также АДВИ проявляются неоднородной структурой и различной эхогенностью стромы, что можно использовать в качестве маркера на этапах ранней и дифференциальной диагностики перечисленных вирусных инфекций.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Дроздова, Н. Ф. Инфекционный мононуклеоз, обусловленный вирусом Эпштейна–Барр: клинико-патогенетические аспекты (обзор литературы) / Н. Ф. Дроздова, В. Х. Фазылов // Вестн. совр. клин. медицины. – 2018. – Т. 11, вып. 3. – С. 59–61.
2. Синдром увеличения лимфатических узлов у детей / А. А. Калинин [и др.] // Дитячий лікар. – 2015. – № 2 (39). – С. 5–12.
3. Меликян, А. Л. Национальные клинические рекомендации по диагностике лимфаденопатий / А. Л. Меликян, А. М. Ковригина, Е. К. Егорова. – Б. м. : Национальное гематологическое общество, 2018. – 30 с.
4. Богадельников, И. В. Лимфаденопатии при инфекционных заболеваниях у детей / И. В. Богадельников, Ф. Хамид, А. В. Кубышкин. – Донецк : Издатель Заславский А. Ю., 2013. – 224 с.
5. Карпукхина, О. А. Клиническая характеристика и дифференциальная диагностика заболеваний, протекающих с мононуклеозоподобным синдромом у детей : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.08 / О. А. Карпукхина ; Волгогр. гос. мед. ун-т. – Волгоград, 2013. – 25 с.
6. Инфекционные лимфаденопатии у детей : метод. указ. для студентов и врачей-интернов / сост. С. В. Кузнецов [и др.]. – Харьков : Харьк. нац. мед. ун-т, 2016. – 32 с.
7. Деякі особливості диференціальної діагностики інфекційного мононуклеозу у дітей / А. І. Бобровицька [та ін.] // Вестн. фізіотерапії та курортології. – 2012. – Т. 18, № 3. – С. 55–57.
8. Никольский, М. А. Ошибки диагностики инфекционного мононуклеоза у детей / М. А. Никольский, Е. Д. Соколова, Д. А. Лиюнов // Педиатрия. Прил. к журн. Consilium Medicum. – 2016. – № 3. – С. 24–28.
9. Эпштейн-Барр вирусная инфекция у детей: совершенствование программы диагностики и лечения / Э. Н. Симованьян [и др.] // Детск. инфекции. – 2016. – № 1. – С. 15–23.
10. Karrer U., Nadal E. Epstein-Barr-Virus und infektiöse Mononukleose / U. Karrer, D. Nadal // Swiss Med. Forum – Schw. Med.-Forum. – 2014. – Vol. 14, N 11. – P. 226–232. <https://doi.org/10.4414/smf.2014.01831>

References

1. Drozdova N. F., Fazylov V. Kh. Infectious mononucleosis caused by the Epstein–Barr virus: clinical and pathogenetic aspects (literature review). *Vestnik sovremennoi klinicheskoi meditsiny* [Bulletin of modern clinical medicine], 2018, vol. 11, no. 3, pp. 59–61 (in Russian).
2. Kalinchuk A. A., Katilov A. V., Dmitriev D. V., Lobodyuk A. A. Syndrome of enlarged lymph nodes in children. *Dityachii likar* [Child doctor], 2015, no. 2 (39), pp. 5–12 (in Russian).
3. Melikyan A. L., Kovrigina A. M., Egorova E. K. *National clinical guidelines for the diagnosis of lymphadenopathies*. S. I., National hematological society, 2018. 30 p. (in Russian).
4. Bogadel'nikov I. V., Khamid F., Kubyshkin A. V. *Lymphadenopathy in infectious diseases in children*. Donetsk, Izdatel' Zaslavskii A. Yu., 2013. 224 p. (in Russian).
5. Karpukhina O. A. *Clinical characteristics and differential diagnosis of diseases occurring with mononucleosis-like syndrome in children*. Abstract of Ph. D. diss. Volgograd, 2013. 25 p. (in Russian).
6. Kuznetsov S. V., Ol'khovskaya O. N., Kopeichenko T. S., Zharkova T. S., Tatarkina A. N., Kucherenko E. O., Grishina I. Ya., Bukii S. N., Ol'khovskii E. S. Infectious lymphadenopathies in children: method. decree. for students and interns. Kharkiv, Kharkiv National Medical University, 2016. 32 p. (in Russian).
7. Bobrovits'ka A. I., Yatsenko I. V., Shvetsova N. V., Orlenko V. V. Some features of the differential diagnosis of infectious mononucleosis in children. *Vestnik fizioterapii i kurortologii* [Physiotherapy and balneology bulletin], 2012, vol. 18, no. 3, pp. 55–57 (in Ukrainian).
8. Nikol'skii M. A., Sokolova E. D., Lioznov D. A. The misdiagnosis of infectious mononucleosis in children *Pediatrics. Pri-lozhenie k zhurnalu Consilium Medicum* [Pediatrics. Consilium Medicum magazine supplement], 2016, no. 3, pp. 24–28 (in Russian).
9. Simovan'yan E. N., Denisenko V. B., Grigoryan A. V., Kim M. A., Bovtalo L. F., Belugina L. V. Epstein-Barr virus infection in children: improving the diagnosis and treatment program. *Detskie infektsii* [Childhood infections], 2016, no. 1, pp. 15–23 (in Russian).
10. Karrer U., Nadal E. Epstein–Barr-Virus und infektiöse Mononukleose. *Swiss Medical Forum – Schweizerisches Medizin-Forum*, 2014, vol. 14, no. 11, pp. 226–232. <https://doi.org/10.4414/smf.2014.01831>

Информация об авторе

Махмутов Равил Фаткулислямович – канд. мед. наук, доцент. Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького (пр. Ильича, 16, 283003, г. Донецк, Украина). E-mail: ravil@dkt.dn.ua. <https://orcid.org/0000-0002-4562-7515>

Information about the author

Ravil F. Makhmutov – Ph. D. (Med.), Associate Professor. M. Gorki Donetsk National Medical University (16, Ilyich Ave., 283003, Donetsk, Ukraine). E-mail: ravil@dkt.dn.ua. <https://orcid.org/0000-0002-4562-7515>