

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

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2022. Том 19, № 1

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2022. Том 19, № 1

Журнал основан в 2004 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

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

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

- Н. П. Канунникова** – Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Республика Беларусь
- С. А. Красный** – Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь
- Н. П. Митьковская** – Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь
- А. Г. Мойсеёнок** – Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Республика Беларусь
- С. П. Рубникович** – Белорусский государственный медицинский университет, 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. Строчкий** – 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

Редакционный совет

- Эдуардас Алекнавичиус** – Национальный институт рака, Вильнюс, Литовская Республика
- Ю. В. Вороненко** – Национальная медицинская академия последиplomного 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
- 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. 2022. Том 19, № 1
Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *С. Н. Костюк*

Подписано в печать 10.02.2022. Выход в свет 25.02.2022. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 44 экз. Заказ 24.
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,67 руб., ведомственная подписка – 29,77 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, 2022

PROCEEDINGS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICAL SERIES, 2022, vol. 19, no. 1

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

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

Nina P. Kanunnikova – Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus

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

Natalya P. Mitkovskaya – Republican Scientific and Practical Center “Cardiology”, Minsk, Republic of Belarus

Andrey G. Moiseenok – Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy
of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

Sergey P. Rubnikovich – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Igor N. Semeneya – Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds 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

Alexander V. Strotsky – 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
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
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, 2022, vol. 19, no. 1.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *S. N. Kostsyuk*

It is sent to the press 10.02.2022. Appearance 25.02.2022. Format 60×84¹/₈. Offset paper. The press digital.
Printed pages 14.88. Publisher's signatures 16.4. Circulation 44 copies. Order 24.
Number price: individual subscription – 12.67 byn., departmental subscription – 29.77 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. Skorina Str., Minsk, 220141, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series, 2022

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

ЗМЕСТ

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Рында Е. Г., Гончаров А. Е., Чиж К. А., Антоневиц Н. Г., Рябцева Т. В., Минич Я. С., Мантивода В. Э. Иммунологическая эффективность пулированных мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки оболочки носовой полости при лечении системной красной волчанки	7
Прилуцкая В. А., Сукало А. В. Прогнозирование осложненного течения раннего неонатального периода у крупновесных доношенных новорожденных	19
Ревтович М. Ю., Красько О. В., Малькевич В. Т., Потейко А. И. Прогнозирование прогрессирования опухолевого процесса у радикально оперированных пациентов, страдающих раком желудка ПВ–ПС стадии, с учетом применения адьювантной перфузионной термохимиотерапии	27
Нарыжная Н. В., Логвинов С. В., Курбатов Б. К., Мухомедзянов А. В., Сиротина М. А., Чепелев С. Н., Висмонт Ф. И., Маслов Л. Н. Эффективность дистантного ишемического посткондиционирования миокарда у крыс с индуцированным метаболическим синдромом зависит от уровня лептина	38
Гусина А. А., Зиновик А. В., Наумчик И. В., Кулак В. Д., Мотюк И. Н., Бойша А. С., Мясников С. О., Стальбыко А. С., Гусина Н. Б. Клинические и молекулярно-генетические характеристики классической гомоцистинурии	48
Полулях О. Е., Калиновская Е. И., Басалай А. А., Мигалевич А. С. Экспрессия генов <i>Fasn</i> и <i>Sirt4</i> и кодируемых ими белков в висцеральной жировой ткани крыс линии Вистар при избыточном потреблении жиров животного происхождения	62
Хоружик С. А., Карман А. В., Жаврид Э. А. Магнитно-резонансно-томографический измеряемый коэффициент диффузии при лимфомах и его зависимость от ряда технических и клинических факторов	70
Горячко А. Н., Сукало А. В. Прогностическая значимость показателей свертывания крови для определения вероятности развития геморрагического синдрома у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией	84
Таганович А. Д., Ковганко Н. Н., Прохорова В. И., Мурашко Д. И., Колб А. В., Готько О. В., Матусевич В. А. Обоснование комплексного определения уровня CYFRA 21-1 и рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44v6 в крови пациентов с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого для прогнозирования риска опухолевой прогрессии	91
Гущин А. А., Адамчик А. А., Рубникович С. П., Запорожская-Абрамова Е. С., Иващенко В. А., Соловьёва Ж. В., Таиров В. В., Рисованный С. И., Денисова Ю. Л. Влияние термовибрационного воздействия на прочностные характеристики композитных материалов, применяемых в стоматологии	103
Якубцевич Р. Э., Ракашевич Д. Н., Невгень И. Н. Эффективность гемосорбции для подавления цитокинового шторма, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2	112
Камендровская А. А., Федянин С. Д., Коваленко А. А., Ратомский Ю. И. Влияние аутологических аспиринов красного костного мозга на микроциркуляцию в нижних конечностях у пациентов с диабетической ангиопатией	120

CONTENTS**CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE**

Rynda A. H., Hancharou A. Y., Chyzh K. A., Antonevich N. G., Rabcava T. Y., Minich Ya. S., Mantsivoda V. E. Immunological efficiency of the pooled mesenchymal stem cells of the olfactory lining of the nasal cavity for systemic lupus erythematosus treatment	7
Prylutskaya V. A., Sukalo A. V. Prediction of the complicated early neonatal period in large for gestational age newborns.....	19
Reutovich M. Yu., Krasko V. V., Malkevich V. T., Patseika A. I. Prognostication of tumor progression in radically operated stage IIB–IIIC cancer patients after undergoing adjuvant perfusion thermochemotherapy.....	27
Naryzhnaya N. V., Logvinov S. V., Kurbatov B. K., Mukhomedyanov A. V., Sirotina M. A., Chepelev S. N., Vismont F. I., Maslov L. N. The efficiency of remote ischemic postconditioning of the myocardium in rats with induced metabolic syndrome depends on the leptin level.....	38
Gusina A. A., Zinovik A. V., Naumchik I. V., Kulak V. D., Motiuk I. N., Boisha A. S., Miasnikov S. O., Stalybko N. S., Gusina N. B. Clinical and molecular genetic characteristics of classical homocystinuria.....	48
Poluliakh O. Y., Kalinovskaya E. I., Basalai A. A., Mihalevich A. S. Expression of the <i>Fasn</i> and <i>Sirt4</i> genes and the proteins they encode in the visceral adipose tissue of Wistar rats against the background of excess fat intake	62
Kharuzhyk S. A., Karman A. V., Zhavrid E. A. Magnetic resonance imaging apparent diffusion coefficient in lymphomas and its dependence on a number of technical and clinical factors.....	70
Harachka A. N., Sukalo A. V. Prognostic significance of blood clotting indicators for determination of the probability of developing the hemorrhagic syndrome in premature newborns with congenital pneumonia	84
Tahanovich A. D., Kauhanka N. N., Prohorova V. I., Murashko D. I., Kolb A. V., Gotko O. V., Matusevich V. A. Rationale importance of integrated determination of the level of CYFRA 21-1 and the receptors CXCR1, CXCR2, CD44v6 in blood of patients with early-stage non-small cell lung cancer for predicting the tumor progression risk.....	91
Gushchin A. A., Adamchik A. A., Rubnikovich S. P., Zaporozhskaya-Abramova E. S., Ivashchenko V. A., Solovyeva Zh. V., Tairov V. V., Risovannyi S. I., Denisova Yu. L. Influence of thermal vibration impact on the strength characteristics of composite materials used in dentistry	103
Yakubtsevich R. E., Rakashevich Dz. N., Neuhen I. N. Hemosorption efficiency for suppressing the cytokine storm caused by coronavirus SARS-CoV-2.....	112
Kamiandrouskaya A. A., Fedzyanin S. D., Kovalenko A. A., Ratomski Yu. I. Effect of autological red bone marrow aspirates on the microcirculation in the lower extremities of patients with diabetic angiopathy.....	120

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

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА
CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 615.37:616.5-002.525.2+57.086.833.4
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-7-18>

Поступила в редакцию 27.08.2021
Received 27.08.2021

**Е. Г. Рында¹, А. Е. Гончаров¹, К. А. Чиж², Н. Г. Антоневиц¹, Т. В. Рябцева²,
Я. С. Минич¹, В. Э. Мантивола¹**

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

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

**ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ПУЛИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ОБОЛОЧКИ НОСОВОЙ ПОЛОСТИ
ПРИ ЛЕЧЕНИИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ**

Аннотация. В патогенезе системной красной волчанки (СКВ) важное место отводится механизмам защиты иммунной системы, многие принципы работы которых, несмотря на их интенсивное изучение, остаются невыясненными. В результате активации Т- и В-клеток увеличивается продукция антител (в том числе аутоантител), наступает гипергаммаглобулинемия, образуются иммунные комплексы. Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) как основы биомедицинского клеточного продукта (БМКП) для клеточной терапии СКВ является обоснованным в связи с тем, что данный тип стволовых клеток обладает широким спектром иммуномодулирующей активности. В последние годы появляется все больше данных о том, что пулированные культуры аллогенных МСК обладают более выраженными и стабильными иммуномодулирующими свойствами в отношении иммунокомпетентных клеток, чем аллогенные МСК, полученные от одного донора.

Целью исследования являлась разработка БМКП на основе пулированных культур МСК для повышения эффективности существующих методов лечения СКВ.

Объектом исследования являлась венозная кровь 6 включенных в испытания пациентов с клинико-лабораторными признаками СКВ и волчаночного нефрита (ВН). Забор и исследование крови осуществляли до проведения клеточной терапии и через 1–1,5 мес. после нее. Для иммунофенотипирования клеток крови применяли метод проточной цитометрии.

Показана иммунологическая эффективность клеточной терапии СКВ с помощью БМКП на основе пулированных МСК, которая выражалась в снижении в периферической крови количества ассоциированных с процессом воспаления иммунокомпетентных клеток (цитотоксических лимфоцитов, активированных и терминально-дифференцированных TEMRA Т-клеток, антител-продуцирующих плазматических клеток). Клиническая эффективность заключалась в остановке прогрессирования и снижении активности СКВ (уменьшение индекса SELENA-SLEDAI в 2 раза – с 10,43 до 5,14), а также в достижении полной ремиссии ВН ($n = 4$) и восстановлении нормального функционирования почек.

Ключевые слова: стволовые клетки, системная красная волчанка, пулированные мезенхимальные стволовые клетки, клеточная терапия, проточная цитометрия

Для цитирования: Иммунологическая эффективность пулированных мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки оболочки носовой полости при лечении системной красной волчанки / Е. Г. Рында [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 7–18. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-7-18>

**Alena H. Rynda¹, Andrei Y. Hancharou¹, Kanstantsin A. Chyzh², Natalia G. Antonevich¹,
Tatsyana Y. Rabcava², Yana S. Minich¹, Veranika E. Mantsivoda¹**

¹*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

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

**IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF THE POOLED MESENCHYMAL STEM CELLS
OF THE OLFACTORY LINING OF THE NASAL CAVITY
FOR SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS TREATMENT**

Abstract. An important place in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) is given to the immune mechanisms, many aspects of which, despite intensive study, remain unclear. As a result of the activation of T and B cells, the production

of antibodies (including autoantibodies) increases, hypergammaglobulinemia occurs, and immune complexes are formed. The use of mesenchymal stem cells (MSCs) as the basis of a biomedical cell product for SLE cell therapy is justified due to the fact that this type of stem cells has a wide immunomodulatory activity range. In recent years, more and more data have appeared that the pooled cultures of allogeneic MSCs have more pronounced and stable immunomodulatory properties in relation to immunocompetent cells, in comparison with allogeneic MSCs obtained from a single donor.

The aim of the study was to develop a biomedical cell product based on pooled cultures of MSCs to increase the effectiveness of the existing methods of treating SLE.

The object of the study was the venous blood of SLE patients with clinical and laboratory lupus nephritis signs included in the trials ($n = 6$). Blood sampling and analysis were carried out before cell therapy and 1–1.5 months after. Immunophenotyping of blood cells was performed using flow cytometry.

The immunological efficacy of SLE cell therapy, which was expressed in a decrease of the number of immunocompetent cells associated with the inflammation process in the peripheral blood (decrease in the content of cytotoxic lymphocytes, activated and terminally differentiated TEMRA T cells, decrease in the number of antibody-producing plasma cells) with the use of poolMSC was shown. Clinical efficacy consisted in stopping the progression and reducing the SLE activity (doubling the SELENA-SLEDAI index from 10.43 to 5.14), as well as in achieving the complete LN remission ($n = 4$) and restoring the normal kidney function.

Keywords: stem cells, systemic lupus erythematosus, pooled mesenchymal stem cells, cell therapy, flow cytometry

For citation: Rynda A. H., Hancharou A. Y., Chyzh K. A., Antonevich N. G., Rabcava T. Y., Minich Ya. S., Mantsivoda V. E. Immunological efficiency of the pooled mesenchymal stem cells of the olfactory lining of the nasal cavity for systemic lupus erythematosus treatment. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 7–18 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-7-18>

Введение. Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой комплексное аутоиммунное заболевание, сложность лечения которого обусловлена наличием широкого спектра клинических проявлений, обилием иммунологических и лабораторных отклонений, а также различным течением и исходом болезни. Патогенез СКВ в настоящее время изучен не в полной мере. Среди вероятных причин развития заболевания выделяют генетические факторы и факторы окружающей среды, дисфункцию Т-клеток, В-клеток и дендритных клеток и выработку антинуклеарных аутоантител [1–3]. Долгое время считалось, что ведущую роль в патогенезе СКВ играют В-клетки, однако было продемонстрировано, что Т-клетки оказывают большее влияние на течение болезни, поскольку они усиливают выработку аутоантител и стимулируют В-клетки к дифференцировке, пролиферации и созреванию [4, 5].

Согласно статистике, две трети пациентов с СКВ на той или иной стадии заболевания страдают от волчаночного нефрита (ВН), который характеризуется почечной недостаточностью различной степени тяжести и является основной причиной смерти этих пациентов. Проявления ВН варьируются от бессимптомных нарушений мочеиспускания до быстро прогрессирующего серповидного гломерулонефрита и терминальной стадии почечной недостаточности.

Полная ремиссия при лечении СКВ достигается редко, поэтому лечение направлено скорее на максимальное понижение уровня активности течения болезни и предотвращение ее прогрессирования, чем на полное выздоровление пациента. Основываясь на рекомендациях Европейской лиги против ревматизма (European League Against Rheumatism – EULAR) по лечению СКВ, можно выделить следующие стратегии, выбор которых зависит от типа и степени тяжести поражения органов. Так, лечение может включать нестероидные противовоспалительные препараты, гидроксихлорохин, низкие и высокие дозы кортикостероидов и несколько групп иммунодепрессантов [6]. Выбор конкретного препарата зависит от локализации очагов повреждения, возраста пациента, потенциала деторождения и стоимости лечения. Все перечисленные лекарственные средства токсичны и зачастую малоэффективны. Таким образом, арсенал лекарственных средств и методов, применяемых в лечении СКВ, ограничен. Требуются новые терапевтические подходы, которые позволили бы улучшить результаты лечения пациентов с СКВ.

Определенные надежды в лечении СКВ в настоящее время возлагают на методы клеточной терапии. Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) как основы биомедицинского клеточного продукта (БМКП) для клеточной терапии СКВ является обоснованным в связи с тем, что данный тип стволовых клеток обладает широким спектром противовоспалительной и иммуномодулирующей активности.

До настоящего времени большинство клинических исследований проводилось с использованием МСК, полученных от одного донора. Поскольку биологическая активность клеток у доно-

ров заметно различается, результаты, полученные в этих исследованиях, были в значительной степени разнородными. Кроме того, доказано, что МСК характеризуется высокой внутрипопуляционной гетерогенностью на клональном уровне. Таким образом, существует проблема в получении БМКП на основе МСК, которые имели бы предсказуемо стабильный уровень пролиферации и иммуносупрессивный потенциал, а также минимальную внутрипопуляционную вариабельность. Решением этой проблемы могут стать БМКП на основе пулированных культур МСК.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлась венозная кровь 6 включенных в испытания пациентов с СКВ, у которых отмечалось поражение других органов или систем (M32.1 по МКБ-10) и имелись клинико-лабораторные признаки ВН (N08.5, N16.4 по МКБ-10).

Забор венозной крови пациентов в пробирки с гепарином до и после инфузии БМКП на основе пулированных МСК (пулМСК) осуществляли на базе ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии».

Материалы и реагенты:

фосфатный буферный раствор без ионов кальция и магния, лизирующий раствор для элиминации эритроцитов (на основе хлорида аммония);

моноклональные антитела к антигенам человека, конъюгированные с флуорохромами: CD8 (PB450, клон MEM-31) (Exbio, Чехия), CD25 (PB450, клон MEM-181) (Exbio, Чехия), CD336 (AIF1405, клон 253415) (R&D, США), CD123 (PB450, клон 6H6) (Exbio, Чехия), CD16 (BV421, клон 3G8) (BD, США), CD21 (PB450, клон LT21) (Exbio, Чехия), CD127 (PB450, клон A01905) (BioLegend, США), CD45 (KO525, клон HI30) (Beckman-Coulter, США), CD19 (KO525, клон HI19) (BioLegend, США), CD1c (KO525, клон L161) (BioLegend, США), CD4 (FITC, клон RPA-T4) (Elabscience, США), Lin (FITC, клон L161) (Exbio, Чехия), CD62L (PE, клон DREG56) (Elabscience, США), HLA-DR (PE, клон Immu357) (Beckman-Coulter, США), CD335 (PE, клон REA808) (Miltenyi Biotec, Германия), CD141 (PE, клон 1A4) (BD, США), CD15, CD24 (PE, клон ML5) (Elabscience, США), CD161 (PE, клон 191B8) (Beckman-Coulter, США), CD14 (PerCP, клон 191B8) (Miltenyi Biotec, Германия), CD10 (PerCP, клон MEM-78) (Exbio, Чехия), CD294 (PerCP, клон BM16) (BD, США), CD279 (PC7, клон EH12.2H7) (BioLegend, США), CD127 (PC7, клон HIL-7R-M21) (BD, США), CD57 (PC7, клон TB01) (EBioscience, США), CD11c (PC7, клон B-ly6) (BD, США), CD33 (PC7, клон 6C5) (Elabscience, США), CD38 (PC7, клон HIT2) (Exbio, Чехия), CD117 (PC7, клон 10402) (Exbio, Чехия), CD45RA (APC, клон 10402) (Exbio, Чехия), Tim3 (APC, клон F38-2E2) (Invitrogen, США), CD3 (APC, клон UCHT1) (Miltenyi Biotec, Германия), CD370 (APC, клон CLEC9A) (Miltenyi Biotec, Германия), CD11b (APC, клон MEM-147) (Exbio, Чехия), CD336 (APC, клон p44-8) (BD, США), CD45 (AIF1 700, клон MEM-28) (Exbio, Чехия), CD3 (APC-Cy7, клон UCHT1) (Exbio, Чехия), CD56 (APC-eF780, клон CMSSB) (Invitrogen, США), HLA-DR (APC-Cy7, клон L243) (Exbio, Чехия), CD27 (APC-Cy7, клон LT27) (Exbio, Чехия), IgD (APC) и IgM (FITC) (Elabscience, США).

Иммунофенотипирование клеток крови. В соответствии с разработанной панелью антител в заранее подписанные пробирки вносили необходимое количество каждого антитела и добавляли 100 мкл венозной крови. Инкубацию проводили в холодильнике в течение 15 мин. После инкубации для осуществления лизиса эритроцитов в пробирки добавляли по 2 мл свежеприготовленного лизирующего раствора ($\times 10$), аккуратно перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин. Затем содержимое пробирок осаждали путем центрифугирования, надосадок сливали, а к осадку добавляли 250–300 мкл фосфатного буфера. Перед учетом на цитометре пробы тщательно перемешивали на вортексе. Учет проводили на цитофлуориметре Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, США). Данные анализировали с помощью программы FCS Express 7 (De Novo Software, США).

Статистический анализ. Для статистической обработки полученных данных использовали программы Statistica версии 12 (StatSoft, США) и StatPlus версии 4.9 (AnalystSoft, США). Значения показателей представлены в виде Mean \pm StdErr и Me (25 %–75 %), где Mean – среднее значение, StdErr – стандартная ошибка средней, Me – медиана, а 25 % и 75 % – интерквартильный размах. Нормальность распределения величин оценивали с помощью *W*-критерия Шапиро–Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, применяли непараметрические методы. Для сравнения двух зависимых выборок использовали *W*-критерий

Уилкоксона. В качестве критерия достоверности различий между показателями принимали уровень значимости $p < 0,05$. Относительные показатели содержания клеток указаны в процентах, абсолютные – в 1 мл.

Результаты и их обсуждение. Иммунологические исследования включали определение в периферической крови субпопуляций Т-клеток (регуляторных, активированных), В-клеток (наивных, регуляторных, минорных субпопуляций), дендритных клеток, естественных киллерных клеток, естественных киллерных Т-клеток, моноцитов, врожденных лимфоидных клеток. В указанный перечень входят популяции иммунокомпетентных клеток, играющих важную роль в патогенезе СКВ, в том числе в активации и торможении иммунитета.

Были сформированы оптимальные для выполнения задач исследования 7 панелей антител, каждая из которых включала 7–10 определяемых молекул на поверхности клеток (табл. 1).

Таблица 1. Панель антител для иммунофенотипирования клеток крови пациентов с СКВ
Table 1. Panel of antibodies for the immunophenotyping of blood cells of patients with SLE

Панель антител	Канал флуоресценции								
	BV421	BV510	FITC	PE	PerCP	PC7	APC	AI700	APC-A750
Миелоидные супрессорные клетки	HLA-DR	CD45	Lin	CD15	CD33	–	CD11b	–	CD14
CD3 ⁺ Т-клетки памяти (дифф. и истоц.)	CD8	CD45	CD4	CD62L	–	CD279	CD45RA	–	CD3
Т-регуляторные/ активированные клетки	CD25	CD45	CD4	HLA-DR	–	CD127	Tim-3	–	CD3
Естественные киллерные клетки/моноциты	CD336	CD45	CD14	CD335	CD56	CD57	CD16	CD45	CD3
Врожденные лимфоидные клетки	CD127	CD45	Lin	CD161	CD294	CD117	CD336	CD45	–
В-клетки	CD21	CD19	IgM	CD24	CD10	CD38	IgD	CD45	CD27
ДК крови	CD123	CD1c	Lin	CD141	CD11c	–	CD370	CD45	HLA-DR

В популяции CD3⁺ Т-лимфоцитов выделяли CD3⁺CD4⁺ Т-хелперы и CD3⁺CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты. При статистической обработке и сравнении абсолютных и относительных показателей содержания Т-клеток у пациентов до и после проведения клеточной терапии было установлено достоверное снижение абсолютного количества Т-клеток (до терапии – 0,8340 (0,6911–0,9520), после терапии – 0,6300 (0,3070–0,6800), $p = 0,043$) и цитотоксических Т-клеток (до терапии – 0,4917 (0,3130–0,5179), после терапии – 0,3214 (0,1541–0,3497), $p = 0,043$).

Абсолютное и относительное содержание Т-хелперов достоверно не отличалось до и после проведения клеточной терапии. При сравнении относительного и абсолютного количества CD4⁺CD8⁺ Т-клеток у пациентов с СКВ до и после терапии пулМСК достоверных различий не выявлено (табл. 2).

Таблица 2. Относительные и абсолютные показатели иммунного статуса пациентов до и после терапии (Т-клетки)

Table 2. Relative and absolute numbers of the immune status of patients before and after cell therapy (T-cells)

Тип клеток	Показатели пациентов основной группы		p (W -критерий Уилкоксона)
	до терапии ($n = 6$)	после терапии ($n = 6$)	
Т-клетки, %	86,05 (76,70–87,60)	80,49 (78,76–87,47)	0,463
Т-хелперы:			
%	34,00 (31,10–40,70)	34,22 (29,53–40,02)	0,892
в 1 мл	0,3718 (0,3237–0,4548)	0,2981 (0,1320–0,3815)	0,225
Цитотоксические Т-клетки, %	53,70 (44,00–54,00)	43,67 (37,67–47,79)	0,345
CD4 ⁺ CD8 ⁺ :			
%	2,30 (2,20–3,30)	3,14 (0,95–7,33)	0,225
в 1 мл	0,0220 (0,016–0,037)	0,0306 (0,0078–0,0617)	0,345

Истощенные Т-клетки – это группа дисфункциональных Т-клеток, наличие которых свидетельствует о хронических инфекциях или опухолях. Состояние истощения развивается поэтапно и характеризуется ослабленной эффекторной цитотоксичностью, сниженной продукцией цитокинов и повышенным синтезом множества ингибирующих молекулярных рецепторов (например, PD-1, TIM-3 и LAG-3) [7–10]. Молекула PD-1 (programmed cell death 1) (CD279) является одним из ключевых факторов, ответственных за подавление передачи сигналов Т-лимфоцитами, опосредуя механизмы толерантности и обеспечивая иммунный гомеостаз. Появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что нарушение функции PD-1 играет важную роль в развитии различных аутоиммунных заболеваний [11].

Абсолютное количество истощенных CD3⁺CD279⁺ у пациентов после клеточной терапии достоверно снижалось более чем в 2 раза (до терапии – 0,2536 (0,1482–0,2536), после терапии – 0,1162 (0,1017–0,1620), $p = 0,043$). Относительное количество истощенных CD3⁺CD279⁺ после применения пулМСК достоверно не менялось (до терапии – 22,70 (15,80–26,60), после терапии – 20,62 (14,70–23,82), $p = 0,345$).

По содержанию Tim-3 Т-клеток достоверных различий между показателями до и после клеточной терапии не обнаружено (табл. 3).

Т-регуляторные клетки обеспечивают периферическую иммунологическую толерантность, участвуют в регуляции интенсивности и направленности иммунного ответа. В связи с тем, что эти клетки способны подавлять избыточный иммунный ответ, их рассматривают в том числе и в качестве БМКП для клеточной терапии СКВ [12]. Абсолютное и относительное содержание Т-регуляторных клеток у пациентов не имело достоверных различий до и после терапии (табл. 3).

Таблица 3. Относительные и абсолютные показатели иммунного статуса пациентов до и после терапии (регуляторные и активированные Т-клетки)

Table 3. Relative and absolute numbers of the immune status of patients before and after cell therapy (regulatory and activated T cells)

Т-клетки	Показатели пациентов основной группы		p (W -критерий Уилкоксона)
	до терапии ($n = 6$)	после терапии ($n = 6$)	
Регуляторные:			
%	2,31 (0,62–2,33)	2,67 (2,25–3,14)	0,500
в 1 мл	0,0108 (0,0071–0,0260)	0,0135 (0,0115–0,0249)	0,686
Tim-3 ⁺ :			
%	0,23 (0,23–0,35)	0,38 (0,32–0,40)	0,345
в 1 мл	0,0022 (0,0011–0,0031)	0,0022 (0,0018–0,0027)	0,686

Для определения активированных Т-лимфоцитов в популяциях в качестве маркера использовали HLA-DR, учитывали CD3⁺HLA-DR⁺ популяцию клеток. Как относительное, так и абсолютное содержание активированных Т-клеток снижалось у пациентов после применения БМКП ($p = 0,043$) (рис. 1).

Т-клетки памяти представлены как цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD8⁺), так и Т-хелперами (CD4⁺). По уровню экспрессии CD45RA, хемокинового рецептора CCR7(CD197) и адгезионной молекулы CD62L (L-селектин) Т-клетки памяти делят на 4 популяции: наивные клетки (naïve), центральные клетки памяти (TCM), эффекторные клетки памяти (TEM) и терминально-дифференцированные эффекторные клетки памяти (TEMRA). Иммунофенотип четырех основных субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти можно представить следующим образом: naïve (CCR7⁺, CD62L⁺, CD45RA⁺, CD45RO⁻), TCM (CCR7⁺, CD62L⁺, CD45RA⁻, CD45RO⁺), TEM (CCR7⁻, CD62L⁻, CD45RA⁻, CD45RO⁺) и TEMRA (CCR7⁻, CD62L⁻, CD45RA⁺, CD45RO^{+/+}) [13–15].

Тенденцию к увеличению относительного содержания CD8⁺ TCM Т-клеток отмечали у пациентов после применения БМКП ($p = 0,080$) (табл. 4).

Уменьшение абсолютного содержания CD8⁺ TEMRA Т-клеток наблюдалось у пациентов после клеточной терапии (до терапии – 0,2041 (0,1326–0,2199), после терапии – 0,0826 (0,0678–0,0841), $p = 0,043$).

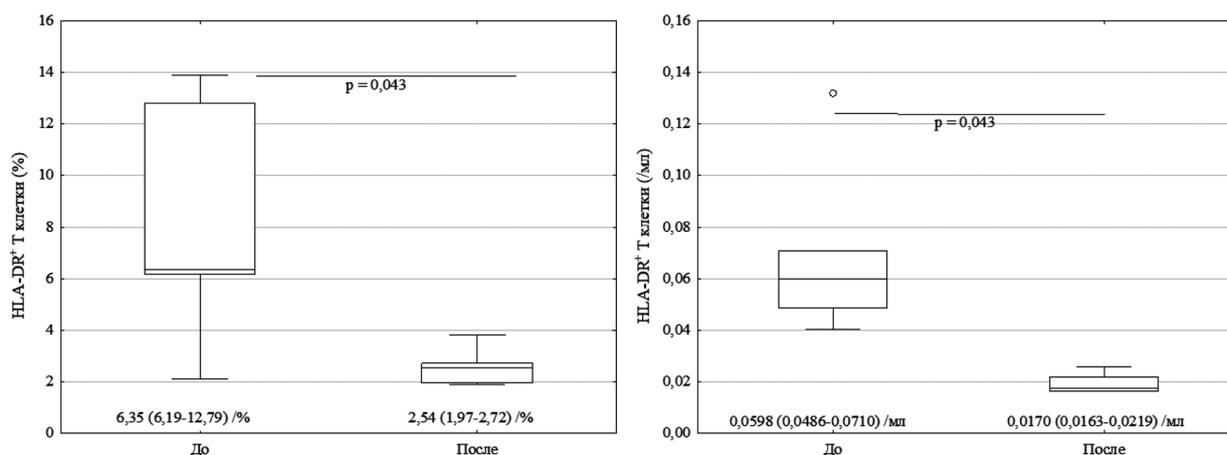


Рис. 1. Относительное и абсолютное содержание активированных Т-клеток у пациентов до и после клеточной терапии

Fig. 1. Relative and absolute content of the activated T-cells in patients before and after cell therapy

Таблица 4. Относительные и абсолютные показатели иммунного статуса пациентов до и после терапии (CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки)Table 4. Relative and absolute numbers of the immune status of patients before and after cell therapy (CD4⁺ and CD8⁺ T cells)

Тип клеток	Показатели пациентов основной группы		<i>p</i> (<i>W</i> -критерий Уилкоксона)
	до терапии (<i>n</i> = 6)	после терапии (<i>n</i> = 6)	
CD4 ⁺ naïve:			
%	13,80 (10,70–16,40)	14,31 (8,51–16,79)	0,686
в 1 мл	0,1542 (0,1019–0,1843)	0,1144 (0,0324–0,1522)	0,225
CD4 ⁺ TCM:			
%	10,90 (8,70–14,40)	13,52 (10,71–16,40)	0,500
в 1 мл	0,1263 (0,1038–0,1278)	0,1151 (0,0520–0,1317)	0,686
CD4 ⁺ TEM:			
%	6,30 (5,90–10,80)	8,20 (5,38–9,97)	0,893
в 1 мл	0,1028 (0,0494–0,1131)	0,0476 (0,0415–0,0547)	0,225
CD4 ⁺ TEMRA:			
%	1,60 (1,50–1,60)	1,24 (0,88–1,44)	0,345
в 1 мл	0,0152 (0,0118–0,0179)	0,0069 (0,0046–0,0097)	0,138
CD8 ⁺ naïve:			
в 1 мл	0,1632 (0,1613–0,2037)	0,1513 (0,0457–0,2198)	0,225
CD8 ⁺ TCM:			
%	1,30 (1,10–2,20)	2,44 (2,05–3,21)	0,080
в 1 мл	0,0145 (0,0103–0,0210)	0,0196 (0,0147–0,0220)	0,686
CD8 ⁺ TEM:			
%	2,10 (2,10–2,70)	5,46 (2,86–11,28)	0,144
в 1 мл	0,0235 (0,0141–0,0371)	0,0354 (0,0241–0,0515)	0,500
CD8 ⁺ TEMRA, %	16,90 (14,60–23,10)	10,40 (9,25–12,35)	0,345

Для определения количества естественных киллерных клеток (ЕК-клетки) и естественных киллерных Т-клеток (ЕКТ-клетки) на точечной цитограмме, построенной в координатах SSC-Area и SSC-Height, выделяли регион, не содержащий клеточные конгломераты. В полученном регионе на цитограмме светорассеяния ограничивали регион лимфоцитов. Клетки в данном регионе проецировали на цитограммах в координатах CD3/CD16. Фенотип ЕК-клеток определяли как CD3⁻CD16⁺, а ЕКТ-клеток – как CD3⁺CD16⁺ [16, 17].

Клеточная терапия не привела к достоверным различиям между показателями содержания ЕК- и ЕКТ-клеток (табл. 5).

Врожденные лимфоидные клетки (innate lymphoid cells (ILCs)) представляют собой клетки врожденной иммунной системы, которые могут напрямую связываться с широким спектром

Т а б л и ц а 5. Относительные и абсолютные показатели иммунного статуса пациентов до и после терапии (ЕК- и ЕКТ-клетки)

Table 5. Relative and absolute numbers of the immune status of patients before and after cell therapy (NK- and NKT-cells)

Тип клеток	Показатели пациентов основной группы		<i>p</i> (<i>W</i> -критерий Уилкоксона)
	до терапии (<i>n</i> = 6)	после терапии (<i>n</i> = 6)	
ЕК-клетки:			
%	4,86 (3,04–5,61)	4,65 (4,15–6,74)	0,500
в 1 мл	0,0458 (0,0340–0,0534)	0,0369 (0,0165–0,0559)	0,500
ЕКТ-клетки:			
%	1,95 (1,70–8,10)	9,17 (6,87–10,84)	0,249
в 1 мл	0,0190 (0,0158–0,0359)	0,0696 (0,0463–0,1021)	0,686

гематопоэтических и негематопоэтических клеток для управления иммунитетом, процессом воспаления и гомеостазом во многих тканях организма [18, 19]. Все врожденные лимфоидные клетки характеризуются классической морфологией лимфоидных клеток, но не обладают экспрессией молекул клеточной поверхности, которые идентифицируют другие типы иммунных клеток и поэтому определяются как отрицательные по маркерам клеточного клонирования клетки (Lin^-) [20, 21].

Определяли следующие субпопуляции врожденных лимфоидных клеток крови: ILC1 ($Lin^-CD127^+CD117^-CD294^-CD161^{+/-}$), ILC2 ($Lin^-CD127^+CD117^{+/-}CD294^+$), ILC3 ($Lin^-CD127^+CD117^+CD294^-CD336^{+/-}$).

При исследовании популяций врожденных лимфоидных клеток было установлено значительное достоверное снижение абсолютного содержания ILC2 у пациентов после терапии ($p = 0,043$), в то время как содержание остальных субпопуляций осталось без изменений (табл. 6).

Миелоидные супрессорные клетки (МЛСК) являются гетерогенной группой активированных незрелых клеток миелоидного происхождения, подавляющих развитие иммунного ответа. Гранулоцитарные МЛСК (Г-МЛСК) характеризуются иммунофенотипом $Lin^-HLA-DR^-CD11b^+CD33^+CD15^+$, моноцитарные МЛСК (М-МЛСК) – $Lin^-HLA-DR^-CD14^+$. Вклад МЛСК в иммунопатогенез СКВ в полной мере не установлен (имеется ряд противоречивых публикаций). Результаты некоторых исследований указывают, что увеличение содержания М-МЛСК коррелирует с более тяжелым течением СКВ, а изменение числа Г-МЛСК также может являться патогенетическим фактором при СКВ, влияя на баланс Th17/Treg [22].

Установлено, что показатели относительного и абсолютного содержания МЛСК достоверно не различались у пациентов до и после терапии (табл. 6).

Моноциты определяли как $CD14^+$ -клетки, среди которых по $CD16$ выделяли классические ($CD14^+CD16^-$), промежуточные ($CD14^+CD16^+$) и неклассические ($CD14^-CD16^+$) [23].

Достоверных отличий между относительным и абсолютным количеством моноцитов у пациентов с СКВ до и после терапии не выявлено (табл. 6).

Т а б л и ц а 6. Относительные и абсолютные показатели иммунного статуса пациентов до и после терапии (ILC, МЛСК, моноциты)

Table 6. Relative and absolute numbers of the immune status of patients before and after cell therapy (ILC, MDSC, monocytes)

Тип клеток	Показатели пациентов основной группы		<i>p</i> (<i>W</i> -критерий Уилкоксона)
	до терапии (<i>n</i> = 6)	после терапии (<i>n</i> = 6)	
ILC-клетки			
ILC1:			
%	1,3575 (0,4440–1,7310)	1,6150 (1,1050–1,9150)	0,173
в 1 мл	0,0105 (0,0031–0,0153)	0,0098 (0,0050–0,0163)	0,345
CD161 ⁺ ILC1:			
%	0,2695 (0,0730–0,6260)	0,5150 (0,2720–0,6450)	0,249
в 1 мл	0,0029 (0,0007–0,0033)	0,0031 (0,0018–0,0055)	0,500

Окончание табл. 6

Тип клеток	Показатели пациентов основной группы		<i>p</i> (<i>W</i> -критерий Уилкоксона)
	до терапии (<i>n</i> = 6)	после терапии (<i>n</i> = 6)	
ILC2:			
%	0,0001 (0,0000–0,0002)	0,0003 (0,0001–0,0004)	0,043
в 1 мл	0,0095 (0,0060–0,0290)	0,0410 (0,0370–0,0490)	0,173
ILC3:			
%	0,0245 (0,0050–0,0420)	0,0490 (0,0000–0,0760)	0,463
в 1 мл	0,0003 (0,0000–0,0003)	0,0002 (0,0000–0,0004)	0,686
МЛСК			
CD15 ⁺ Г-МЛСК:			
%	0,257 (0,029–0,486)	0,010 (0,003–0,080)	0,116
в 1 мл	0,0022 (0,0005–0,0023)	0,0000 (0,0000–0,0010)	0,225
CD33 ⁺ Г-МЛСК:			
%	0,013 (0,002–0,028)	0,009 (0,008–0,028)	0,686
в 1 мл	0,0001 (0,0001–0,0002)	0,0001 (0,0001–0,0001)	0,686
М-МЛСК:			
%	6,0450 (3,2800–8,2800)	3,6250 (1,5100–5,6300)	0,500
в 1 мл	0,0387 (0,0263–0,0723)	0,0148 (0,0148–0,0429)	0,500
Моноциты:			
%	7,50 (5,74–11,75)	7,13 (3,35–10,51)	0,600
в 1 мл	0,0711 (0,0546–0,1008)	0,0353 (0,0353–0,0480)	0,345
Классические:			
%	71,21 (69,22–83,04)	72,36 (46,37–88,82)	0,345
в 1 мл	0,6709 (0,6686–0,9279)	0,4082 (0,4082–0,5030)	0,225
Промежуточные:			
%	26,25 (11,09–27,20)	22,95 (10,76–53,46)	0,345
в 1 мл	0,1239 (0,1197–0,2560)	0,1739 (0,1739–0,4555)	0,500
Неклассические:			
%	1,08 (0,08–2,54)	0,24 (0,12–3,08)	0,996
в 1 мл	0,0119 (0,0056–0,0136)	0,0012 (0,0012–0,0259)	0,893

Дендритные клетки – основные антигенпрезентирующие клетки, включающие две основные популяции ДК: миелоидные ДК (мДК) и плазмцитойдные ДК (пДК). мДК экспрессируют типичные миелоидные антигены CD11c, CD13, CD33, CD11b и специфические молекулы CD1c (BDCA-1), CD141 (BDCA-3) и CD370. У пДК отсутствуют миелоидные антигены, и эти клетки экспрессируют CD123 и HLA-DR [24]. Тенденция к увеличению количества клеток субпопуляции CD370⁺ мДК2 была отмечена у пациентов после клеточной терапии ($p = 0,075$) (табл. 7).

Таблица 7. Относительные и абсолютные показатели иммунного статуса пациентов до и после терапии (ДК-клетки)

Table 7. Relative and absolute numbers of the immune status of patients before and after cell therapy (DC)

Дендритные клетки крови	Показатели пациентов основной группы		<i>p</i> (<i>W</i> -критерий Уилкоксона)
	до терапии (<i>n</i> = 6)	после терапии (<i>n</i> = 6)	
мДК:			
%	0,112 (0,017–0,134)	0,146 (0,078–0,188)	0,345
в 1 мл	0,0044 (0,0010–0,0050)	0,0031 (0,0023–0,0058)	0,893
CD1c ⁺ мДК1:			
%	0,108 (0,017–0,129)	0,131 (0,071–0,174)	0,345
в 1 мл	0,0041 (0,0010–0,0048)	0,0029 (0,0022–0,0054)	0,893
CD370 ⁺ мДК2:			
%	0,003 (0,00–0,007)	0,011 (0,007–0,023)	0,075
в 1 мл	0,0002 (0,0001–0,0003)	0,0003 (0,0002–0,0004)	0,465
пДК:			
%	0,068 (0,008–0,113)	0,028 (0,024–0,036)	0,249
в 1 мл	0,0014 (0,0005–0,0036)	0,0009 (0,0004–0,0010)	0,178

В-клетки выполняют несколько иммунологических функций, но рассматриваются в основном в качестве регуляторов иммунных ответов и как основные участники при патогенезе заболеваний, связанных с иммунитетом, из-за их способности вырабатывать антитела [25]. За последние два десятилетия были открыты их дополнительные функции, такие как участие в презентации антигена, продукция множества цитокинов и ингибирующая способность, которая в основном обуславливается секрецией IL-10 [26]. Нами определялись следующие типы В-клеток:

- незрелые лимфоциты зародышевых центров (GC): CD27⁻CD10⁺CD38⁺IgM⁺;
- «переходные»: CD27⁻CD38^{hi}CD24^{hi}IgD^{-/lo}IgM^{hi};
- наивные: virgin naïve (CD27⁻CD10⁻CD38⁻IgD⁺), activated naïve (CD27⁻CD38⁺IgD⁺);
- регуляторные В-клетки: CD27⁻CD21⁺CD24⁺IgM^{hi};
- изотип – непереключенные В-клетки памяти: CD27⁺CD38^{lo}IgD⁺;
- изотип – переключенные В-клетки памяти: CD27⁺CD38^{lo}IgM⁻IgD⁻;
- плазмобласты/плазматические клетки: CD27⁺CD38^{hi}IgM⁻IgD⁻.

Тенденция к снижению абсолютного содержания В-клеток наблюдалась после применения пулМСК ($p = 0,080$). Кроме того, отмечалась тенденция к уменьшению относительных и абсолютных значений транзиторных, В-регуляторных клеток ($p = 0,068$) и абсолютного содержания активированных наивных В-клеток ($p = 0,080$) (табл. 8).

Таблица 8. Относительные и абсолютные показатели иммунного статуса пациентов до и после терапии (В-клетки)

Table 8. Relative and absolute numbers of the immune status of patients before and after cell therapy (B cells)

Тип клеток	Показатели пациентов основной группы		<i>p</i> (<i>W</i> -критерий Уилкоксона)
	до терапии (<i>n</i> = 6)	после терапии (<i>n</i> = 6)	
В-клетки: % в 1 мл	4,84 (1,38–7,12) 0,0394 (0,0325–0,0796)	3,62 (2,15–4,58) 0,0200 (0,0156–0,0282)	0,463 0,080
Изотип – переключ.: % в 1 мл	0,07 (0,01–0,13) 0,0013 (0,0005–0,0013)	0,15 (0,04–0,24) 0,0008 (0,0003–0,0012)	0,249 0,893
Изотип – непереключ.: % в 1 мл	0,18 (0,14–0,29) 0,0025 (0,0014–0,0027)	0,57 (0,10–0,74) 0,0032 (0,0010–0,0048)	0,249 0,500
Наивные: % в 1 мл	0,08 (0,06–0,09) 0,0007 (0,0006–0,0008)	0,10 (0,01–0,23) 0,0006 (0,0001–0,0019)	0,753 0,893
Активированные: % в 1 мл	0,32 (0,23–1,77) 0,0055 (0,0033–0,0083)	0,45 (0,11–0,74) 0,0026 (0,0009–0,0050)	0,600 0,138
В-клетки памяти: % в 1 мл	1,75 (1,00–2,84) 0,0134 (0,0133–0,0219)	1,69 (0,88–2,14) 0,0115 (0,0056–0,0126)	0,753 0,225
Транзиторные: % в 1 мл	0,02 (0,00–0,04) 0,0002 (0,0001–0,0002)	0 0	0,068 0,068
В-регуляторные: % в 1 мл	0,06 (0,00–0,17) 0,0008 (0,0002–0,0010)	0 0	0,068 0,068
Незрелые: % в 1 мл	0,01 (0,00–0,04) 0,0001 (0,0000–0,0002)	0 0	0,180 0,180
Активированные наивные: % в 1 мл	0,07 (0,00–0,39) 0,0010 (0,0008–0,0018)	0,01 (0,00–0,01) 0,0001 (0,0000–0,0001)	0,142 0,080
В-клетки герминативного центра: % в 1 мл	0,01 (0,00–0,03) 0,0001 (0,0000–0,0004)	0,01 (0,00–0,01) 0,0000 (0,0000–0,0001)	0,418 0,201

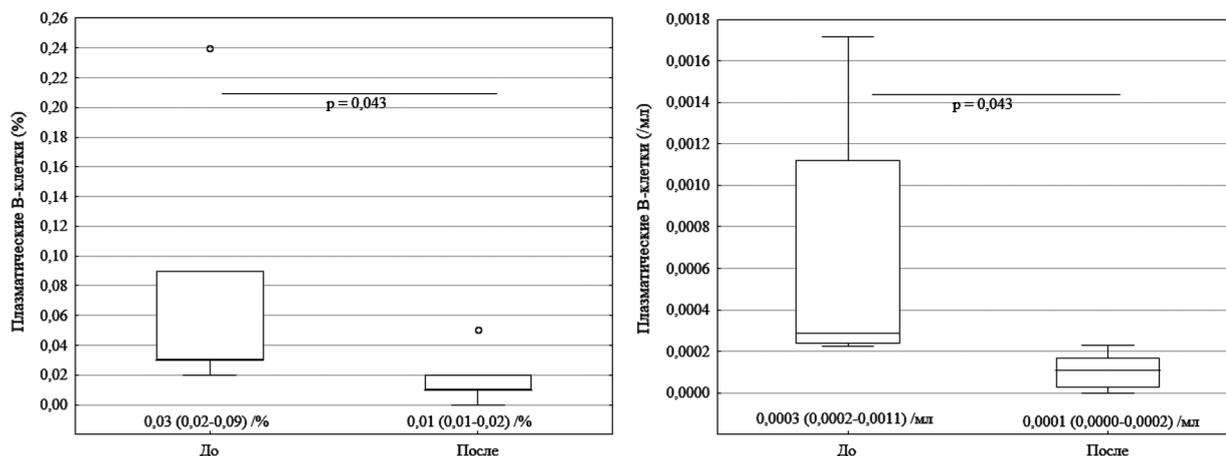


Рис. 2. Относительное и абсолютное содержание плазматических В-клеток у пациентов до и после клеточной терапии

Fig. 2. Relative and absolute content of the plasma B-cells in patients before and after cell therapy

Достоверное уменьшение относительного и абсолютного количества плазматических В-клеток было обнаружено у пациентов после терапии ($p = 0,043$) (рис. 2).

Заключение. В результате проведенных испытаний применения БМКП на основе пулМСК при лечении пациентов с СКВ и ВН была показана иммунологическая эффективность клеточной терапии СКВ, которая выражалась в снижении в периферической крови количества иммунокомпетентных клеток, ассоциированных с процессом воспаления (цитотоксических лимфоцитов, активированных и терминально-дифференцированных ТЕМРА Т-клеток, антител-продуцирующих плазматических клеток). Клиническая эффективность проведенного лечения заключалась в остановке прогрессирования СКВ, снижении активности заболевания (уменьшение индекса SELENA-SLEDAI в 2 раза – с 10,43 до 5,14), а также в достижении полной ремиссии ВН у четырех пациентов и восстановлении нормального функционирования почек.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Perl, A. Pathogenic mechanisms in systemic lupus erythematosus / A. Perl // *Autoimmunity*. – 2010. – Vol. 43, N 1. – P. 1–6. <https://doi.org/10.3109/08916930903374741>
2. Choi, J. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update / J. Choi, S. T. Kim, J. Craft // *Curr. Opin. Immunol.* – 2012. – Vol. 24, N 6. – P. 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.10.004>
3. Petri, M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus / M. Petri // *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* – 2002. – Vol. 16, N 5. – P. 847–858. <https://doi.org/10.1053/berh.2002.0259>
4. Shlomchik, M. J. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease / M. J. Shlomchik, J. E. Craft, M. J. Mamula // *Nat. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 1, N 2. – P. 147–153. <https://doi.org/10.1038/35100573>
5. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus / G. C. Tsokos [et al.] // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2016. – Vol. 12, N 12. – P. 716–730. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.186>
6. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus / A. Fanouriakis [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2019. – Vol. 78, N 6. – P. 736–745. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215089>
7. Zeng, Z. Exhausted T cells and epigenetic status / Z. Zeng, F. Wei, X. Ren // *Cancer Biol. Med.* – 2020. – Vol. 17, N 4. – P. 923–936. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0338>
8. Kahan, S. M. T cell exhaustion during persistent viral infections / S. M. Kahan, E. J. Wherry, A. J. Zajac // *Virology*. – 2015. – Vol. 479–480. – P. 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.033>
9. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice / M. J. Ansari [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198, N 1. – P. 63–69. <https://doi.org/10.1084/jem.20022125>
10. Francisco, L. M. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity / L. M. Francisco, P. T. Sage, A. H. Sharpe // *Immunity*. – 2010. – Vol. 236. – P. 219–242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x>
11. PD-1/PD-L and autoimmunity: a growing relationship / M. R. Zamani [et al.] // *Cell Immunol.* – 2016. – Vol. 310. – P. 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.09.009>
12. Mizui, M. Targeting regulatory T cells to treat patients with systemic lupus erythematosus / M. Mizui, G. C. Tsokos // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 786. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00786>
13. The who's who of T cell differentiation: human memory T cell subsets / Y. D. Mahnke [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2013. – Vol. 43, N 11. – P. 2797–2809. <https://doi.org/10.1002/eji.201343751>

14. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy / D. H. Busch [et al.] // *Semin. Immunol.* – 2016. – Vol. 28, N 1. – P. 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.02.001>
15. CD4+ regulatory and effector/memory T cell subsets profile motor dysfunction in Parkinson's disease / J. A. H. Saunders [et al.] // *J. Neuroimm. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 7, N 4. – P. 927–938. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9402-z>
16. Cooper, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets / M. A. Cooper, T. A. Fehniger, M. A. Caligiuri // *Trends Immunol.* – 2001. – Vol. 22, N 11. – P. 633–640. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)02060-9)
17. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset / S. Lopez-Vergès [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 116, N 19. – P. 3865–3874. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-282301>
18. Pulendran, B. New paradigms in type 2 immunity / B. Pulendran, D. Artis // *Science.* – 2012. – Vol. 337, N 6093. – P. 31–35. <https://doi.org/10.1126/science.1221064>
19. Iwasaki, A. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // *Science.* – 2010. – Vol. 327, N 5963. – P. 291–295. <https://doi.org/10.1126/science.1183021>
20. Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature / H. Spits [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13, N 2. – P. 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>
21. Artis, D. The biology of innate lymphoid cells / D. Artis, H. Spits // *Nature.* – 2015. – Vol. 517, N 7534. – P. 293–301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>
22. Myeloid-derived suppressor cells contribute to systemic lupus erythematosis by regulating differentiation of Th17 cells and Tregs / J. Ji [et al.] // *Clin. Sci.* – 2016. – Vol. 130, N 16. – P. 1453–1467. <https://doi.org/10.1042/CS20160311>
23. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood / L. Ziegler-Heitbrock [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 116, N 16. – P. e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>
24. Collin, M. Human dendritic cell subsets / M. Collin, N. McGovern, M. Haniffa // *Immunology.* – 2013. – Vol. 140, N 1. – P. 22–30. <https://doi.org/10.1111/imm.12117>
25. Shlomchik, M. J. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease / M. J. Shlomchik, J. E. Craft, M. J. Mamula // *Nat. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 1, N 2. – P. 147–153. <https://doi.org/10.1038/35100573>
26. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells / D. P. Harris [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2000. – Vol. 1, N 6. – P. 475–482. <https://doi.org/10.1038/82717>

References

1. Perl A. Pathogenic mechanisms in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 2010, vol. 43, no. 1, pp. 1–6. <https://doi.org/10.3109/08916930903374741>
2. Choi J., Kim S. T., Craft J. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update. *Current Opinion in Immunology*, 2012, vol. 24, no. 6, pp. 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.10.004>
3. Petri M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, 2002, vol. 16, no. 5, pp. 847–858. <https://doi.org/10.1053/berh.2002.0259>
4. Shlomchik M. J., Craft J. E., Mamula M. J. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, 2001, vol. 1, no. 2, pp. 147–153. <https://doi.org/10.1038/35100573>
5. Tsokos G. C., Lo M. S., Reis P. C., Sullivan K. E. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology*, 2016, vol. 12, no. 12, pp. 716–730. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.186>
6. Fanouriakis A., Kostopoulou M., Alunno A., Aringer M., Bajema I., Boletis J. N. [et al.]. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2019, vol. 78, no. 6, pp. 736–745. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215089>
7. Zeng Z., Wei F., Ren X. Exhausted T cells and epigenetic status. *Cancer Biology and Medicine*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 923–936. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0338>
8. Kahan S. M., Wherry E. J., Zajac A. J. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*, 2015, vol. 479–480, pp. 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.033>
9. Ansari M. J., Salama A. D., Chitnis T., Smith R. N., Yagita H., Akiba H. [et al.]. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, vol. 198, no. 1, pp. 63–69. <https://doi.org/10.1084/jem.20022125>
10. Francisco L. M., Sage P. T., Sharpe A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*, 2010, vol. 236, pp. 219–242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x>
11. Zamani M. R., Aslani S., Salmaninejad A., Javan M. R., Rezaei N. PD-1/PD-L and autoimmunity: a growing relationship. *Cellular Immunology*, 2016, vol. 310, pp. 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.09.009>
12. Mizui M., Tsokos G. C. Targeting regulatory T cells to treat patients with systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 2018, vol. 9, art. 786. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00786>
13. Mahnke Y. D., Brodie T. M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T cell differentiation: human memory T cell subsets. *European Journal of Immunology*, 2013, vol. 43, no. 11, pp. 2797–2809. <https://doi.org/10.1002/eji.201343751>
14. Busch D. H., Fräßle S. P., Sommermeier D., Buchholz V. R., Riddell S. R. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. *Seminars in Immunology*, 2016, vol. 28, no. 1, pp. 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.02.001>
15. Saunders J. A. H., Estes K. A., Kosloski L. M., Allen H. E., Dempsey K. M., Torres-Russotto D. R. [et al.]. CD4+ regulatory and effector/memory T cell subsets profile motor dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2012, vol. 7, no. 4, pp. 927–938. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9402-z>
16. Cooper M. A., Fehniger T. A., Caligiuri M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 2001, vol. 22, no. 11, pp. 633–640. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)02060-9)

17. Lopez-Vergès S., Milush J. M., Pandey S., York V. A., Arakawa-Hoyt J., Pircher H., Norris P. J., Nixon D. F., Lanier L. L. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 19, pp. 3865–3874. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-282301>
18. Pulendran B., Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science*, 2012, vol. 337, no. 6093, pp. 31–35. <https://doi.org/10.1126/science.1221064>
19. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 2010, vol. 327, no. 5963, pp. 291–295. <https://doi.org/10.1126/science.1183021>
20. Spits H., Artis D., Colonna M., Dieffenbach A., Di Santo J. P., Eberl G. [et al.]. Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, 2013, vol. 13, no. 2, pp. 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>. PMID: 23348417.
21. Artis D., Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 2015, vol. 517, no. 7534, pp. 293–301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>
22. Ji J., Xu J., Zhao S., Liu F., Qi J., Song Y., Ren J., Wang T., Dou H., Hou Y. Myeloid-derived suppressor cells contribute to systemic lupus erythematosus by regulating differentiation of Th17 cells and Tregs. *Clinical Science*, 2016, vol. 130, no. 16, pp. 1453–1467. <https://doi.org/10.1042/CS20160311>
23. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D. N. [et al.]. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 16, pp. e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>
24. Collin M., McGovern N., Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 2013, vol. 140, no. 1, pp. 22–30. <https://doi.org/10.1111/imm.12117>
25. Shlomchik M. J., Craft J. E., Mamula M. J. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, 2001, vol. 1, no. 2, pp. 147–153. <https://doi.org/10.1038/35100573>
26. Harris D. P., Haynes L., Sayles P. C., Duso D. K., Eaton S. M., Lepak N. M., Johnson L. L., Swain S. L., Lund F. E. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology*, 2000, vol. 1, no. 6, pp. 475–482. <https://doi.org/10.1038/82717>

Информация об авторах

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

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

Чиж Константин Аркадьевич – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dr.chyzh@rambler.ru

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

Рябцева Татьяна Владимировна – науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ta-yana@mail.ru

Минич Яна Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yana-minich@tut.by

Мантивола Вероника Эдуардовна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: veronikamantivoda@gmail.com

Information about the authors

Alena H. Rynda – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alenarynda@gmail.com

Andrei Y. Hancharou – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Kanstantsin A. Chyzh – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dr.chyzh@rambler.ru

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

Tatsyana Y. Rabcava – Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ta-yana@mail.ru

Yana S. Minich – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yana-minich@tut.by

Veranika E. Mantsivoda – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: veronikamantivoda@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 618.291-053.31-036-06

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-19-26>

Поступила в редакцию 04.11.2021

Received 04.11.2021

В. А. Прилуцкая, А. В. Сукало*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ОСЛОЖНЕННОГО ТЕЧЕНИЯ РАННЕГО НЕОНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА У КРУПНОВЕСНЫХ ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Аннотация. Цель исследования – разработать метод прогнозирования осложненного течения раннего неонатального периода у крупновесных к сроку гестации новорожденных для оптимизации и повышения эффективности оказания медицинской помощи данной категории детей.

Проведено обследование 157 крупновесных новорожденных. Исследуемую группу составили 105 детей с крупной массой тела при рождении. Контроль корректной работы регрессионной модели проведен на экзаменационной выборке, включавшей 52 крупновесных новорожденных. Группа контроля – 221 ребенок с соответствующим сроку гестации физическим развитием. Проанализированы анамнестические, клинические, лабораторные, инструментальные, морфологические данные с последующим определением наиболее значимых факторов, ассоциированных с нарушениями ранней адаптации у детей. Прогнозируемым событием считали осложненное течение раннего неонатального периода, что определялось наличием одного или нескольких заболеваний у новорожденного ребенка.

На основании многофакторного регрессионного анализа установлено, что наиболее значимыми прогностическими факторами, ассоциированными с риском дезадаптации большевесных новорожденных, являются прегравидарная масса тела матери более 70 кг, способ родоразрешения, коэффициент гармоничности при рождении 26,5 кг/м³ и более, уровень палочкоядерных нейтрофилов в общем анализе крови на 1–2-е сутки жизни. Разработана математическая модель определения вероятности осложненного течения раннего неонатального периода у крупновесных к сроку гестации детей и рассчитано ее пороговое значение. Создана классификационная схема, которая позволяет на основе подсчета баллов отнести младенца к группе риска осложненного течения раннего неонатального периода для своевременной коррекции программы обследования и лечения. Показано, что разработанная мультивариантная математическая модель и созданная на ее основе классификационная схема устойчиво работают на экзаменационной выборке и могут быть использованы в организациях здравоохранения всех уровней перинатальной помощи.

Ключевые слова: новорожденные, крупновесный к сроку гестации, ранний неонатальный период, факторы риска, математическая модель, ROC-анализ, коэффициент гармоничности

Для цитирования: Прилуцкая, В. А. Прогнозирование осложненного течения раннего неонатального периода у крупновесных доношенных новорожденных / В. А. Прилуцкая, А. В. Сукало // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 19–26. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-19-26>

Veranika A. Prylutskaya, Alexander V. Sukalo*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

PREDICTION OF THE COMPLICATED EARLY NEONATAL PERIOD IN LARGE FOR GESTATIONAL AGE NEWBORNS

Abstract. The aim of the study is to develop a method for predicting the complicated course of the early neonatal period in the large newborns for gestational age in order to optimize and increase the efficiency of medical care for this category of children.

A survey of 157 large newborns large for gestational age was carried out. The study group consisted of 105 large newborns for gestational age. The control of the correct operation of the regression model was carried out on an examination sample of children with large birth weight ($n = 52$). The control group consisted of 221 newborns with the physical development corresponding to the gestational age (appropriate for the gestational age). The anamnestic, clinical, laboratory, instrumental, morphological data were analyzed with a subsequent determination of the most significant factors associated with early adaptation disorders in newborns. The predicted event was considered to be a complicated course of the early neonatal period, which was determined by the presence of one or more diseases in a newborn.

Based on the multivariate regression analysis, it was found that the most significant prognostic factors associated with the disadaptation risk of large newborns were the pregravid maternal body weight of more than 70 kg, the delivery mode, the harmonicity coefficient (ponderal index) at a birth of 26.5 kg/m³ or more, the neutrophils level in the complete blood count on the 1–2 days of life. A mathematical model was developed for determining the probability of a complicated course

of the early neonatal period in the large newborns large for gestational age. The threshold value was calculated and a classification scheme was created, allowing one to calculate the infant's belonging to the risk group of the complicated course of the early neonatal period based on the calculation of points for timely correction. It is shown that the developed multivariate mathematical model and the classification scheme based on it work steadily on the examination sample and can be used in practice in health care organizations at all levels of perinatal care.

Keywords: newborns, large for gestational age, early neonatal period, risk factors, mathematical model, ROC analysis, ponderal index

For citation: Prylutskaya V. A., Sukalo A. V. Prediction of the complicated early neonatal period in large for gestational age newborns. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 19–26 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-19-26>

Введение. Масса тела (МТ) новорожденного является одновременно маркером пренатального состояния и надежным предиктором здоровья новорожденных детей [1]. Универсального определения чрезмерного роста при рождении не существует. Согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), большими для гестационного возраста считаются дети с МТ выше 90-го перцентиля с учетом их гестационного возраста и пола. У крупновесных детей более высокий риск мертворождения, неблагоприятных акушерских и неонатальных исходов, а также метаболических нарушений в последующие возрастные периоды [2]. Во многом частота перинатальных осложнений при крупном плоде зависит от симметричности, или гармоничности, его физического развития [2, 3], которую можно установить с использованием производных антропометрических индексов (индекса массы тела (ИМТ), пондерал индекса, коэффициента гармоничности (КГ)).

Актуальной для современных перинатологии и педиатрии является разработка диагностических программ с превентивно-профилактической направленностью в рамках индивидуального подхода к детям групп риска. Одна из основных задач врача-неонатолога – своевременное распознавание стадии и глубины патогенетического процесса симптомокомплекса заболеваний в каждом конкретном случае. Значимость своевременной диагностики и профилактики нарушений при ранней адаптации большевесных новорожденных диктует необходимость разработки способа прогнозирования дезадаптации, основанного на информативных современных показателях, включая анамнестические, антропометрические, биохимические и гормональные маркеры. Важным условием является простота и доступность использования математических моделей в учреждениях всех уровней оказания медицинской помощи.

Цель исследования – разработать метод прогнозирования осложненного течения раннего неонатального периода у крупновесных к сроку гестации новорожденных для оптимизации и повышения эффективности оказания медицинской помощи данной категории детей.

Объекты и методы исследования. Проспективное когортное исследование проведено на клинической базе Белорусского государственного медицинского университета в Республиканском научно-практическом центре «Мать и дитя» в период с 2018 по 2021 г. Выполнено медицинское обследование и проанализирована медицинская документация 157 крупновесных новорожденных детей. Исследуемую группу составили 105 новорожденных с МТ при рождении выше 90-го перцентиля. Контроль корректной работы регрессионной модели проведен на экзаменационной выборке, которая включала 52 крупновесных к сроку гестации новорожденных. Группа контроля – 221 ребенок с соответствующим сроку гестации физическим развитием. Гестационный возраст младенцев всех групп наблюдения колебался от 37,0 до 41,0 недели. Показатели МТ при рождении новорожденных исследуемой и экзаменационной выборки превышали 90-й перцентиль.

Критерии включения в исследование: крупновесные к сроку гестации доношенные новорожденные, отсутствие отказа женщины от использования данных в исследовании.

Критерии исключения из исследования: новорожденные от матерей с наличием сопутствующей соматической патологии в стадии декомпенсации, онкологическими заболеваниями, сахарным диабетом первого и второго типа, употреблением психоактивных веществ; дети из многоплодной беременности; наличие гемолитической болезни, выявленной хромосомной патологии, генетических заболеваний и болезней обмена у новорожденного.

Программа исследования, карта обследования новорожденных детей, форма информированного согласия для выполнения исследований одобрены и утверждены на заседании комитета

по этике при Республиканском научно-практическом центре «Мать и дитя». На всех обследованных новорожденных получены информированные согласия от законных представителей (мать или отец). Проанализированы анамнестические, клинические, лабораторные, инструментальные, морфологические данные с последующим определением наиболее значимых факторов, ассоциированных с нарушениями ранней адаптации у детей.

Наблюдение за пациентами и их обследование начинали непосредственно в родильном зале, а при необходимости продолжали в отделениях новорожденных родильного дома и стационара. Прогнозируемым событием считали осложненное течение раннего неонатального периода, что определялось наличием одного или нескольких заболеваний у новорожденного ребенка.

Основными заболеваниями в первой и второй исследуемой группах были: врожденная пневмония (код МКБ-10: P23); инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода (код МКБ-10: P37, P39); дыхательные расстройства (код МКБ-10: P22); умеренная асфиксия при рождении (код МКБ-10: P21.1); гипоксическая ишемическая энцефалопатия новорожденного (код МКБ-10: P91.6); неонатальная желтуха (код МКБ-10: P59); синдром новорожденного от матери с гестационным сахарным диабетом (ГСД) (код МКБ-10: P70.0); кефалогематома при родовой травме (код МКБ-10: P12.0); паралич Эрба при родовой травме (код МКБ-10: P14.0). В исследуемой группе осложненное течение раннего неонатального периода отмечалось у 33 (31,4 %) детей, в экземационной – у 21 (40,4 %).

При оценке антропометрического статуса дополнительно рассчитывали показатель z-score, отражающий стандартное отклонение исследуемого показателя от медианы эталонной популяции по отношению к возрасту и полу. ИМТ вычисляли по формуле Кетле (отношение массы тела в килограммах к длине тела в метрах, возведенной в квадрат). Для расчета производных антропометрических показателей и оценки физического развития новорожденных использовали программу Intergrowth-21st [4]. Гармоничность развития новорожденных оценивали с использованием КГ или пондерал индекса, рассчитанного как отношение массы тела в килограммах к длине тела в метрах, возведенной в куб. Гармонично развитыми считали новорожденных с КГ = 22,5–25,5 кг/м³ [1, 3].

Проведен сравнительный анализ данных анамнеза жизни, особенностей течения беременности и родов у матерей, клинических, инструментальных и лабораторных (гематологические и биохимические параметры, показатели липидного статуса, уровни адипоцитокинов, витамина Д) методов исследования у матерей и детей в первые двое суток жизни. Во всех случаях после родов проводили макроскопическое исследование последа с расчетом площади поверхности плаценты и последующим гистологическим исследованием. Уровни адипоцитокинов (лептина, адипонектина, висфатина), витамина Д в сыворотке крови женщин и пуповинной крови детей определяли иммуноферментным методом. Совокупное количество изученных факторов – 278.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета программ Statistica 10, SPSS 26, Microsoft Excel. Качественные признаки представлены абсолютными величинами и относительными частотами. Проверку на нормальность распределения количественных признаков осуществляли по критериям Лиллиефорса, Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Для отбора предикторов мультивариантной модели проводили моновариантный анализ. Для всех показателей рассчитывали отношение шансов (ОШ) с доверительным интервалом ($\pm 95\%$ ДИ) и уровень статистической значимости. Построение прогностической модели осуществляли с помощью метода логистической регрессии [5, 6]. Использовали метод пошагового включения предикторов, который ранжирует признаки в соответствии с их вкладом в модель. Относительный вклад отдельных предикторов определяли с помощью статистики Вальда (распределение χ^2), а также стандартизованного коэффициента регрессии. Качество приближения регрессионной модели оценивали при помощи функции правдоподобия, мерой которой служит отрицательное удвоенное значение логарифма этой функции ($-2LL$), меру определенности – с использованием критериев Кокса–Снелла и Найджелкерка (R^2). Точность модели оценивали с помощью индекса конкордации (c-index), который в случае логистической регрессии определяется площадью под кривой операционных характеристик (AUC). Для обеспечения возможности практического применения математической модели на ее основе была построена классификационная схема. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Проведено исследование всех факторов, предположительно влияющих на риск осложненного течения раннего неонатального периода у крупновесных доношенных новорожденных. В табл. 1 приведены параметры логистической регрессии для факторов, имеющих максимальную статистическую значимость влияния на вероятность дезадаптации новорожденных. Среди дихотомических факторов статистически значимыми были: прегравидарные избыточная масса и ожирение матери (ОШ 3,76 (95 % ДИ 1,57–8,99), $p = 0,003$); прегравидарное ожирение матери (ОШ 5,22 (95 % ДИ 2,05–13,32), $p = 0,002$); плацентарная недостаточность (ОШ 4,00 (95 % ДИ 1,43–11,22), $p = 0,008$); ГСД (ОШ 4,58 (95 % ДИ 1,24–16,95), $p = 0,023$); кесарево сечение (ОШ 3,51 (95 % ДИ 1,35–9,12), $p = 0,010$). Исследуемые факторы (прегравидарные МТ, ИМТ, гестационная прибавка МТ, площадь плаценты, уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке крови матери, МТ, перцентиль МТ, z-score МТ при рождении, срок гестации, КГ, адипонектин сыворотки пуповинной крови) – количественные, поэтому ОШ показывает не отношение между некоторыми группами, а отношение прогнозов при изменении значения фактора на единицу (например, для МТ матери – на килограмм). Среди количественных факторов значимую связь с вероятностью осложненного течения неонатального периода показали уровни прегравидарных МТ ($p = 0,004$), ИМТ матери ($p = 0,001$), содержание ЛПВП в сыворотке крови матери ($p = 0,027$), срок гестации ($p = 0,006$), перцентиль МТ ($p = 0,040$) и z-score МТ ($p = 0,010$) при рождении, относительное количество палочкоядерных нейтрофилов ($p = 0,001$).

Таблица 1. Прогностическая значимость факторов

Table 1. Predictive significance of factors

Предиктор	ОШ	95 % ДИ ОШ	Статистическая значимость различий
Прегравидарная МТ матери, кг	1,04	1,02–1,07	0,001
Гестационная прибавка МТ матери, кг	0,92	0,86–0,99	0,033
Прегравидарный ИМТ матери, кг/м ²	1,11	1,04–1,19	0,001
Прегравидарные избыточная масса и ожирение матери, %	3,76	1,57–8,99	0,003
Прегравидарное ожирение матери, %	5,22	2,05–13,32	0,001
Плацентарная недостаточность, %	4,00	1,43–11,22	0,008
Гестационный сахарный диабет, %	4,58	1,24–16,95	0,023
Кесарево сечение, %	3,51	1,35–9,12	0,010
Площадь плаценты, см ²	1,003	0,999–1,008	0,174
ЛПВП в сыворотке крови матери, ммоль/л	0,30	0,11–0,87	0,027
Срок гестации, сут	0,91	0,86–0,98	0,006
МТ ребенка при рождении, г	1,001	1,000–1,002	0,153
Коэффициент гармоничности, кг/м ³	1,34	1,07–1,67	0,011
Перцентиль МТ при рождении	1,22	1,01–1,48	0,040
Перцентиль МТ при рождении более 97	2,50	0,99–6,29	0,051
z-score МТ при рождении	2,67	1,26–5,63	0,010
Адипонектин в сыворотке пуповинной крови, мкмоль/л	0,96	0,92–1,01	0,069
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,29	1,12–1,49	0,001

Математическая модель прогноза вероятности осложненного течения раннего неонатального периода у крупновесных детей разработана на основе мультивариантной логистической регрессии. В качестве предикторов для математической модели рассматривались все выявленные факторы риска в разных сочетаниях. Выбор наилучшего варианта основывался на достижении максимальных уровней значимости коэффициентов логистической регрессии и максимальной диагностической точности. В окончательную модель вошли четыре предиктора: прегравидарная МТ матери, операция кесарева сечения, коэффициент гармоничности ребенка при рождении, относительное количество палочкоядерных нейтрофилов. Однако, поскольку прегравидарная МТ матери и КГ ребенка являются количественными показателями, имеющими непропорциональное влияние на вероятность прогнозируемого события, было признано целесообразным преобразовать их в дихотомические показатели. Категоризация переменных была произведена по методу *cut point* [5, 6], основанному на поиске максимума отношения шансов в точке разделения положительного и не-

гативного прогнозов. В результате процедуры категоризации были получены следующие факторы прогноза: прегравидарная МТ матери более 70 кг – ОШ = 13,9 (95 % ДИ 2,8–69,0), КГ ребенка при рождении 26,5 кг/м³ и более – ОШ = 7,8 (95 % ДИ 1,9–31,7). Из приведенных в табл. 2 данных следует, что наибольшее влияние на риск попадания в группу высокого риска осложненного течения неонатального периода оказывает показатель «КГ при рождении 26,5 кг/м³ и более», коэффициент при котором равен 2,007, а также «прегравидарная МТ матери более 70 кг» со значением 1,840.

Таблица 2. Переменные в уравнении прогностической модели

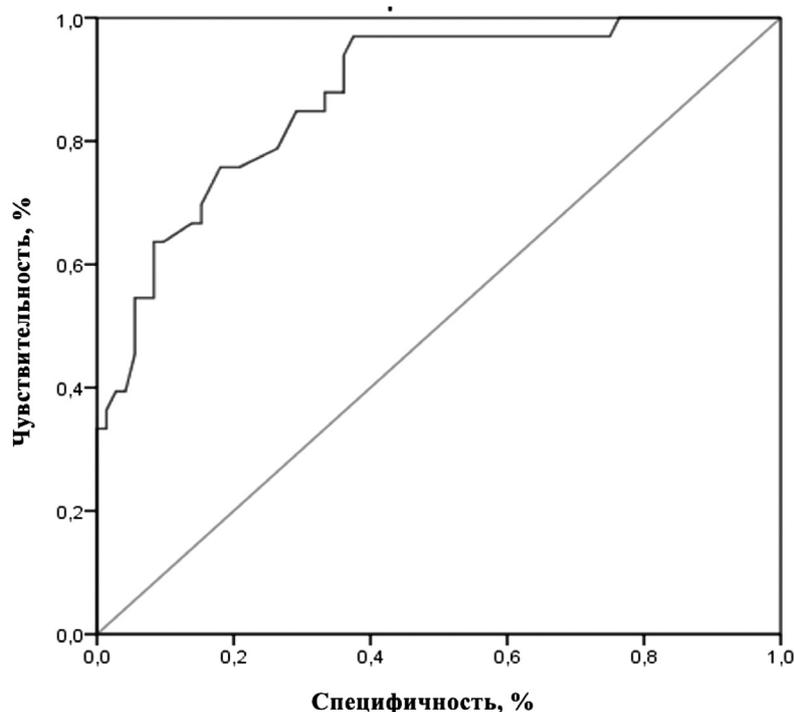
Table 2. Variables in the predictive model equation

Показатель	Коэффициент регрессии (В)	Ехр коэффициента регрессии (В) (95 % ДИ)	Достигнутый уровень значимости
Прегравидарная МТ матери более 70 кг	1,840	6,300 (1,945–20,403)	0,002
Операция кесарева сечения, %	1,587	4,888 (1,403–17,035)	0,013
Коэффициент гармоничности при рождении 26,5 кг/м ³ и более	2,007	7,441 (1,954–28,330)	0,003
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,344	1,410 (1,160–1,714)	0,001
Константа	-7,176	0,001	<0,0001

Вероятность осложненного течения раннего неонатального периода у крупновесных новорожденных можно вычислить по формуле

$$P = \exp^{-7,176 + 1,840X1 + 1,587X2 + 2,007X3 + 0,344X4} / (1 + \exp^{-7,176 + 1,840X1 + 1,587X2 + 2,007X3 + 0,344X4}),$$

где P – интегрированный результат регрессионного вычисления комбинации значений определяемых показателей; \exp ($\approx 2,718$) – основание натурального логарифма, прегравидарная масса тела матери более 70 кг (X1), кесарево сечение (X2), коэффициент гармоничности новорожденного (X3), величина палочкоядерных нейтрофилов (%) в общем анализе крови новорожденного на 1–2-е сутки жизни (X4); числа перед значениями переменных X1–X4 – коэффициенты логистической регрессии. Разработанная прогностическая модель имеет следующие характеристики: $-2LL = 83,187$, $R^2 = 0,511$. Объединенные тесты для коэффициентов модели дают $\chi^2 = 47,535$, $p < 0,0001$.



ROC-анализ качества разработанной прогностической модели

ROC analysis of the quality of the developed predictive model

На рисунке представлена ROC-кривая диагностических характеристик для математической модели, прогнозирующей риск осложненного течения раннего неонатального периода у больше-весных новорожденных. Диагностическая точность модели составила 87,5 % (95 % ДИ 80,1–94,4). Для практического применения в качестве точки разделения положительного и отрицательного прогнозов выбрана предсказанная вероятность 0,233 и соответствующие ей диагностические характеристики: чувствительность – 84,8 %, специфичность – 70,8 %.

Приведенный выше метод точного расчета вероятности осложненного течения применять неудобно, поэтому нами разработана классификационная схема, в соответствии с которой факторам риска с учетом их вклада в вероятность негативного прогноза присваивали баллы, которые затем суммировали, а полученный результат сравнивали с пороговым значением (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Классификационная схема определения факторов риска осложненного течения раннего неонатального периода у крупновесных новорожденных детей

Table 3. Classification scheme for determining the risk factors for a complicated course of the early neonatal period in large for gestational age newborns

Фактор риска	Баллы	Пороговое значение суммы баллов
Преэклампсия МТ матери более 70 кг	11	Σ > 25
Операция кесарева сечения, %	9	
Коэффициент гармоничности при рождении 26,5 кг/м ³ и более	13	
Палочкоядерные нейтрофилы, %	Значение показателя×2	

Рассмотрим примеры расчета.

1. Ребенок Г. (девочка с МТ при рождении 4200 г). Преэклампсия МТ матери – 52,0 кг, роды путем кесарева сечения, КГ новорожденного – 23,12 кг/м³, содержание палочкоядерных нейтрофилов в общем анализе крови в первые сутки жизни – 2 %. Расчет: МТ матери менее 70 кг, следовательно, $0 \times 11 = 0$, роды путем кесарева сечения – $1 \times 9 = 9$, КГ ребенка менее 26,5 – $0 \times 13 = 0$, критерий $4 - 2 \times 2 = 4$, итого – $0 + 9 + 0 + 4 = 13$ баллов.

Заключение. Так как сумма баллов менее порогового значения, то прогнозируемый риск осложненного течения раннего неонатального периода низкий.

2. Ребенок М. (мальчик с МТ при рождении 4250 г). Преэклампсия МТ матери – 120,0 кг, роды путем кесарева сечения, КГ ребенка – 23,92 кг/м³, уровень палочкоядерных нейтрофилов – 13 %. Расчет: МТ матери более 70 кг – $1 \times 11 = 11$ баллов, кесарево сечение – $1 \times 9 = 9$ баллов, КГ ребенка менее 26,5 – $0 \times 13 = 0$ баллов, палочкоядерные нейтрофилы – $13 \times 2 = 26$ баллов, сумма – $11 + 9 + 0 + 26 = 46$ баллов.

Заключение. Так как сумма баллов более 25, то прогнозируемый риск осложненного течения раннего неонатального периода высокий. Требуется тщательный динамический мониторинг клинико-лабораторных показателей и своевременная коррекция программы оказания медицинской помощи при выявлении отклонений.

По данной классификационной схеме получено 29 истинноположительных результатов (ИП), 51 – истинноотрицательный (ИО), 21 – ложноположительный (ЛП), 4 – ложноотрицательных (ЛО). Соответственно, классификационная схема обеспечивает чувствительность 87,9 %, специфичность – 70,8 %.

Работоспособность модели проверяли на экзаменационной выборке, включавшей 52 крупновесных ребенка. Оценку вероятности неблагоприятного течения раннего неонатального периода у детей проводили с использованием разработанной классификационной схемы. Количество ИП результатов составило 18, ИО – 25, ЛП – 6, ЛО – 3. Таким образом, из 52 обследованных прогнозы для 43 (82,7 %) был предсказан верно. Чувствительность – 85,7 %, специфичность – 80,6 %. Можно заключить, что разработанные мультивариантная математическая модель и классификационная схема на ее основе устойчиво работают на экзаменационной выборке.

Результаты проведенного исследования позволяют обосновать включение выявленных предикторов дезадаптации новорожденных с крупной МТ при рождении в комплекс диагностиче-

ских мероприятий для повышения точности прогнозирования осложненного течения раннего неонатального периода у данной категории детей. Разработанная на основании математической модели классификационная схема рациональна, информативна и может быть использована в ежедневной медицинской практике.

Выводы

1. В результате проведенного исследования установлены наиболее значимые факторы, ассоциированные с развитием одного или нескольких заболеваний у крупновесных к сроку гестации новорожденных: прегравидарные МТ и ИМТ матери, гестационная прибавка МТ, плацентарная недостаточность, уровень липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови матери, кесарево сечение, срок гестации, перцентиль МТ, z-score МТ и коэффициент гармоничности при рождении, относительное количество палочкоядерных нейтрофилов в общем анализе крови ребенка.

2. Выявлены наиболее значимые факторы, позволяющие прогнозировать осложненное течение раннего неонатального периода у большевесных новорожденных (прегравидарная МТ матери более 70 кг, рождение путем операции кесарева сечения, коэффициент гармоничности при рождении 26,5 кг/м² и более, относительное количество палочкоядерных нейтрофилов в общем анализе крови ребенка), и на их основании разработана высокой точности математическая модель для определения вероятности дезадаптации у данной категории пациентов.

3. На основании математической модели создана классификационная схема, позволяющая посредством подсчета баллов определить принадлежность крупновесного ребенка к группе риска осложненного течения раннего неонатального периода с реализацией заболеваний, требующих перевода и лечения в стационарных условиях, что дает возможность провести своевременную коррекцию лечебно-диагностических мероприятий.

4. Использование доступных анамнестических, а также клиничко-диагностических данных, результаты валидации на экзаменационной выборке дают возможность имплементировать разработанные математическую модель и классификационную схему в практическую деятельность в организациях здравоохранения II–IV технологического уровня перинатальной помощи. Это позволит врачам-неонатологам персонализировать прогноз осложненного течения раннего неонатального периода и выбор методов оказания медицинской помощи у крупновесных к сроку гестации новорожденных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают признательность канд. техн. наук, доценту А. П. Мириленко за помощь в статистической обработке результатов.

Acknowledgements. The authors are grateful to Ph. D. (Tech.), Associate Professor A. P. Mirylenka for help in statistical processing of the results.

Список использованных источников

1. Born large for gestational age: bigger is not always better / V. Chiavaroli [et al.] // *J. Pediatr.* – 2016. – Vol. 170. – P. 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.11.043>
2. Factors associated with increased risk of early severe neonatal morbidity in late preterm and early term infants / T. S. Mengistu [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2021. – Vol. 10, N 6. – Art. 1319. <https://doi.org/10.3390/jcm10061319>
3. Сукало, А. В. Большевесные новорожденные дети: перспективы физического развития и состояния здоровья / А. В. Сукало, Г. Ф. Елиневская, В. А. Прилуцкая. – Минск : Беларус. навука, 2016. – 87 с.
4. The Global Health network [Electronic resource]. – Mode of access : <https://intergrowth21.tghn.org/standards-tools/>. – Date of access : 25.05.2021.
5. Ланг, Т. А. Как описать статистику в медицине : рук. для авт., ред. и рец. / Т. А. Ланг, М. Сесик ; пер. с англ. ; под ред. В. П. Леонова. – М. : Практическая медицина, 2011. – 480 с.
6. Петри, А. Наглядная медицинская статистика : учеб. пособие для врачей / А. Петри, К. Сэбин ; пер. с англ. ; под ред. В. П. Леонова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 216 с.

References

1. Chiavaroli V., Derraik J. G., Hofman P. L., Cutfield W. S. Born large for gestational age: bigger is not always better. *Journal of Pediatrics*, 2016, vol. 170, pp. 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.11.043>

2. Mengistu T. S., Schreiber V., Flatley C., Fox J., Kumar S. Factors associated with increased risk of early severe neonatal morbidity in late preterm and early term infants. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, vol. 10, no. 6, art. 1319. <https://doi.org/10.3390/jcm10061319>

3. Sukalo A. V., Elinevskaya G. F., Prylutsкая V. A. Large for gestational age newborns: prospects for physical development and health. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2016. 87 p. (in Russian).

4. *The Global Health network*. Available at : <https://intergrowth21.tghn.org/standards-tools/> (accessed 25.05.2021).

5. Lang T. A., Sesik M. *How to report statistics in medicine*. Moscow, Prakticheskaya meditsina Publ., 2011. 480 p. (in Russian).

6. Petri A., Sebin K. *Medical Statistics at a Glance. 3rd ed.* Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2019. 216 p. (in Russian).

Информация об авторах

Прилуцкая Вероника Анатольевна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 2489861@rambler.ru

Сукало Александр Васильевич – академик, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: childill1@bsmu.by

Information about the authors

Veranika A. Prylutsкая – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 2489861@rambler.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). E-mail: childill1@bsmu.by

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.33-006.6-089.166-085.28-037

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-27-37>

Поступила в редакцию 17.05.2021

Received 17.05.2021

М. Ю. Ревтович¹, О. В. Красько², В. Т. Малькевич³, А. И. Потейко³¹*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь*²*Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*³*Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь***ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА У РАДИКАЛЬНО ОПЕРИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ ЖЕЛУДКА IIВ–IIIС СТАДИИ, С УЧЕТОМ ПРИМЕНЕНИЯ АДЬЮВАНТНОЙ ПЕРФУЗИОННОЙ ТЕРМОХИМИОТЕРАПИИ**

Аннотация. Высокая вероятность прогрессирования рака желудка (РЖ) после радикальных операций определяет актуальность проведения исследований, направленных на выявление потенциальных предикторов клинического течения РЖ в отдаленные сроки после проведения противоопухолевого лечения.

Объектами исследования являлись 345 радикально оперированных по поводу РЖ пациентов (pT4a-bN0-3M0, III–IV тип по R. Borjmann) в период с 2008 по 2018 г., у 68 из которых интраоперационно была проведена перфузионная термохимиотерапия (цисплатин 50 мг/м², доxorubicin 50 мг/м², 1 ч, 42 °С). Для оценки отдаленных результатов лечения (выживаемости, свободной от прогрессирования, – ВСП) использованы метод множительных оценок Каплана–Мейера, многофакторный анализ (модель Кокса).

Установлено, что неблагоприятными факторами, ассоциированными с прогрессированием РЖ, являются: метастатическое поражение регионарного лимфоколлектора (pN1-2 – относительный риск (ОР) 1,7 (95 % ДИ 1,2–2,5), $p_{\text{Cox}} = 0,003$; pN1-2 – ОР 3,6 (95 % ДИ 2,5–5,1), $p_{\text{Cox}} < 0,001$), степень распространенности опухолевого процесса, требующая выполнения гастрэктомии (в стандартном или комбинированном варианте) или комбинированной дистальной резекции желудка в отличие от стандартной субтотальной резекции желудка (ОР 1,4 (95 % ДИ 1,1–1,8), $p_{\text{Cox}} = 0,017$), а также ситуации, когда объем лечебных мероприятий ограничивается только радикальным хирургическим лечением (ОР 1,6 (95 % ДИ 1,1–2,2), $p_{\text{Cox}} = 0,012$). По результатам регрессионного анализа (модель Кокса) построена номограмма для расчета ВСП, применение которой требует оценки категории pN и объема проведенного лечения (объем перенесенной операции и наличия или отсутствия перфузионной термохимиотерапии). Отмечена высокая информативность предложенной номограммы – индекс конкордации составил 0,67.

Разработанная номограмма позволяет с высокой точностью прогнозировать ВСП у пациентов с инфильтративными формами РЖ pT4a-bN0-3M0 на основании учета клинико-морфологических особенностей опухолевого процесса и объема проведенного радикального лечения.

Ключевые слова: рак желудка, интраоперационная интраперитонеальная термохимиотерапия, характер прогрессирования, номограмма

Для цитирования: Прогнозирование прогрессирования опухолевого процесса у радикально оперированных пациентов, страдающих раком желудка IIВ–IIIС стадии, с учетом применения адьювантной перфузионной термохимиотерапии / М. Ю. Ревтович [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 27–37. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-27-37>

Mikhail Yu. Reutovich¹, Volha V. Krasko², Victor T. Malkevich³, Aliaksandr I. Patseika³¹*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus*²*United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*³*N. N. Alexandrov National Cancer Center, Minsk, Republic of Belarus***PROGNOSTICATION OF TUMOR PROGRESSION IN RADICALLY OPERATED STAGE IIВ–IIIС CANCER PATIENTS AFTER UNDERGOING ADJUVANT PERFUSION THERMOCHEMOTHERAPY**

Abstract. The study topicality was conditioned by a need to find potential predictors of gastric cancer (GC) clinical progression in view of a high probability of long-term gastric cancer development in the post-surgery period.

The study was conducted during 2008–2018 and involved 345 radically operated gastric cancer patients (pT4a-bN0-3M0, types III–IV according to the R. Borjmann classification). Out of this cohort, 68 patients underwent intraoperative hyperthermic chemoperfusion (cisplatin 50 mg/m², doxorubicin 50 mg/m², 1 hour, 42 °C). Long-term treatment results (progression-free survival (PFS)) were assessed by means of the Kaplan-Meier estimator method and the Cox multivariate analysis.

The unfavorable factors resulting in the GC progression included the metastatic damage of the regional lymph node (pN1-2 – RR 1.7 (95 % CI 1.2–2.5), $p_{\text{Cox}} = 0.003$; pN1-2 – RR 3.6 (95 % CI 2.5–5.1), $p_{\text{Cox}} < 0.001$), the extent of the tumor process requiring either a standard or combined gastrectomy or a combined distal stomach resection in comparison with a standard subtotal stomach resection (RR 1.4 (95 % CI 1.1–1.8), $p_{\text{Cox}} = 0.017$), and the situations where the patient treatment volume was limited to only radical surgery (RR 1.6 (95 % CI 1.1–2.2), $p_{\text{Cox}} = 0.012$). Based on the results of the Cox regression analysis, the nomogram was developed to predict PFS using the evaluation of the pN category and the volume of administered therapeutic procedures (surgical intervention extent and administration or non-administration of hyperthermic chemoperfusion). The nomogram demonstrated a highly predictive performance scoring a concordance index of 0.67.

The proposed nomogram provides a fairly high accuracy of predicting PFS in the infiltrative GC patients (pT4a-bN0-3M0) proceeding from the tumor morphology evaluation and the radical treatment extent.

Keywords: gastric cancer, hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, recurrence patterns, nomogram

For citation: Reutovich M. Yu., Krasko V. V., Malkevich V. T., Patseika A. I. Prognostication of tumor progression in radically operated stage IIB–IIIC cancer patients after undergoing adjuvant perfusion thermochemotherapy. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 27–37 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-27-37>

Введение. Результаты хирургического лечения при раке желудка (РЖ) можно считать удовлетворительными лишь при начальных стадиях опухолевого процесса. В Республике Беларусь практически у 60 % пациентов РЖ выявляется на III–IV стадии [1], когда даже после радикальной операции более 85 % заболевших погибают от дальнейшего прогрессирования опухолевого процесса. На сегодняшний день применение перфузионной интраоперационной интраперитонеальной термохимиотерапии (ИИТХТ) рассматривается в качестве одного из вариантов предупреждения прогрессирования опухолевого процесса у радикально оперированных пациентов с язвенно-инфильтративным и диффузно-инфильтративным РЖ [2]. Тем не менее в ряде случаев подобного комплексного лечения оказывается недостаточно для предупреждения прогрессирования РЖ, что может быть обусловлено неполным учетом всех факторов неблагоприятного прогноза и отсутствием дифференцированного подхода к определению необходимого объема адъювантного лечения РЖ [3]. Следовательно, проведение исследований, направленных на определение потенциальных предикторов клинического течения РЖ в отдаленные сроки после проведения радикального лечения на основании персонализированной прогностической оценки клинико-морфологических особенностей опухолевого процесса и проведенного лечения, представляется актуальным. Персонализированная прогностическая оценка подразумевает использование номограмм, преимуществами которых являются возможность индивидуального прогнозирования, а не отнесение пациента к определенной прогностической категории [4].

Цель исследования – оценить факторы риска прогрессирования рака желудка IIB–IIIC стадии (III–IV тип по Borrmann, pT4a-bN0-3M0) после радикального хирургического лечения, в том числе после применения адъювантной перфузионной интраоперационной интраперитонеальной термохимиотерапии, и разработать на основании полученной информации модель прогнозирования выживаемости, свободной от прогрессирования.

Объекты и методы исследования. В исследование были включены 345 пациентов (213 мужчин, 132 женщины), которым в период с 2008 по 2018 г. проведено радикальное хирургическое лечение по поводу РЖ IIB–IIIC стадии без распространения на абдоминальный сегмент пищевода (III–IV тип по Borrmann, pT4a-bN0-3M0). Возраст пациентов варьировался от 24 до 87 лет, составив в среднем 62 ± 11 лет. Радикальное хирургическое лечение включало выполнение гастрэктомии или субтотальной резекции желудка в сочетании с лимфодиссекцией D2 согласно рекомендациям Японской ассоциации по изучению рака желудка (Japanese Gastric Cancer Association – JGCA, 1998). Пациентам группы 1, включавшей 68 человек (44 мужчины, 24 женщины) в возрасте от 24 до 73 лет (средний возраст 56 ± 8 лет), после завершения формирования анастомозов и ушивания лапаротомной раны проведена перфузионная ИИТХТ с помощью аппарата Thermochem HT-1000 с использованием цисплатина 50 мг/м^2 и доксорубицина 50 мг/м^2 (продолжительность – 1 ч, температура перитонеального перфузата – 42°C). Пациентам группы 2 (277 человек – 169 мужчин, 108 женщин, средний возраст 63 ± 11 лет) было проведено только радикальное хирургическое лечение. Пациенты до 40 лет в группах 1 и 2 составили 4 (5,9 %) и 5 (1,8 %) соответственно ($p = 0,079$). Характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика пациентов

Table 1. Patient characteristics

Признак	Группа 1 (n = 68)	Группа 2 (n = 277)	p
pT:			
pT4a	55 (80,9 %)	224 (80,9 %)	>0,99
pT4b	13 (19,1 %)	53 (19,1 %)	
pN:			
pN0	23 (33,8 %)	78 (28,2 %)	0,424
pN1	8 (11,8 %)	55 (19,9 %)	
pN2	15 (22,1 %)	53 (19,1 %)	
pN3	22 (32,4 %)	91 (32,9 %)	
G:			
GI	6 (8,8 %)	8 (2,9 %)	0,139
GII	17 (25 %)	67 (24,2 %)	
GIII	39 (57,4 %)	167 (60,3 %)	
GIV	6 (8,8 %)	35 (12,6 %)	

Различия в частоте встречаемости pT, pN, G в группах оценивали с помощью критерия χ^2 . В качестве критерия оценки отдаленных результатов использована выживаемость, свободная от прогрессирования (ВСП). В качестве события при расчете принимали факт регистрации прогрессирования РЖ, а также факт смерти от причины, связанной с основным заболеванием, т. е. с РЖ. Наблюдение рассматривалось как «полное», если имелись данные о событии, при отсутствии информации о событии – как «цензурированное». Сравнительный анализ выживаемости проводили, используя log-rank тест Мантела–Кокса.

Влияние применяемого варианта лечения и характеристик опухолевого процесса на выживаемость оценивали с помощью непараметрической модели пропорциональных рисков Кокса [5], значимость влияния фактора риска на выживаемость – с помощью критерия Вальда (Wald test). При проведении регрессионного анализа пропорциональных рисков Кокса параметр считали значимо влияющим на исход при $p < 0,05$. Относительный риск (ОР) рассчитывали как экспоненциальное преобразование соответствующего коэффициента регрессии, доверительные интервалы – на основе соответствующих доверительных интервалов коэффициентов регрессии также путем экспоненциального преобразования.

С целью оценки производительности модели (пригодности для прогноза), включающей в себя калибровку для предотвращения переобучения и смещения и определение дискриминационной мощности модели, проведена процедура внутренней валидации полученной модели [6] с помощью бутстрепинга с 5000 повторами по следующим показателям (индексам): $D_{ху}$ ($D_{ху}$ -статистика, которая демонстрирует, насколько исход объясняется линейной комбинацией предикторов, и которая связана с индексом конкордации как $2(C - 0,5)$, где C – индекс конкордации), D (индекс дискриминации, характеризующий способность модели различать группы благоприятного и неблагоприятного прогноза), U (индекс ненадежности между калиброванной моделью и исходными данными), S (калибровочный уклон для оценки степени согласия между наблюдаемыми и прогнозируемыми рисками развития неблагоприятного исхода).

Статистический анализ данных выполнялся с помощью статистического пакета R v. 3.1.1 (GPL лицензия) [7] с использованием пакетов *survival* [8] и *rms* [9].

Результаты исследования. Медиана наблюдения составила 73 мес. Признаки прогрессирования опухолевого процесса отмечены у 224 пациентов, медиана наблюдения до прогрессирования составила 20 мес.

Проведение интраперитонеальной химиотерапии привело к снижению общего количества случаев прогрессирования РЖ, в том числе метастатической перитонеальной диссеминации – у 37 (54,4 %) из 68 пациентов. В то же время в группе контроля прогрессирование опухолевого процесса было отмечено у 187 (67,5 %) из 277 пациентов. Следствием этого явилось увеличение в группе 1 показателей 3- и 5-летней ВСП до $47,1 \pm 6,3$ и $42,1 \pm 6,3$ % соответственно (для сравнения: после

радикального хирургического лечения (группа 2) эти же показатели составили $36,5 \pm 3,0$ и $27,1 \pm 2,9$ %, $p_{\log\text{-rank}} = 0,01$).

Для оценки влияния на прогноз местнораспространенного РЖ интраперитонеальной химиотерапии проведен регрессионный анализ с использованием модели пропорциональных рисков Кокса. В модель в качестве ковариат были включены потенциально неблагоприятные для развития прогрессирования опухолевого процесса факторы, в частности степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN), степень дифференцировки первичной опухоли (G). Кроме того, в модель была включена ковариата, характеризующая объем перенесенного лечения (стандартная или комбинированная гастрэктомия, стандартная или комбинированная субтотальная резекция желудка). Поскольку данный фактор определяется степенью местной распространенности опухолевого процесса (pT4a или pT4b, pN), это может оказать негативное влияние на прогноз РЖ при распространенном опухолевом процессе, когда возникает необходимость выполнения комбинированной операции у данной когорты пациентов (например, у пациентов с опухолью pT4bN1-3M0). Кроме того, выполнение стандартной радикальной операции у пациентов с инвазией первичной опухолью серозной оболочки (pT4a) и/или распространением опухоли на соседние структуры (pT4b) сопровождается более интенсивной диссеминацией опухолевых клеток в брюшной полости, что также потенциально может негативно повлиять на течение РЖ в отдаленные сроки после хирургического лечения, особенно при отсутствии адьювантной перфузионной ИИТХТ (табл. 2).

Таблица 2. Оценка относительного риска наступления неблагоприятного исхода, связанного с прогрессированием РЖ (модель Кокса)

Table 2. Assessment of the relative risk of an adverse outcome associated with gastric cancer progression (Cox model)

Факторы, ассоциированные с неблагоприятным исходом	Результаты регрессионного анализа				
	Предварительная модель		Окончательная модель		
	β	p	β	ОР (95 % ДИ)	p
Возраст	0	0,566	–		
T4b против T4a	0,15	0,398	–		
Аденокарцинома GII против GI	0,15	0,708	–		
Аденокарцинома GIII против GI	–0,01	0,978	–		
Аденокарцинома GIV против GI	0,17	0,673	–		
pN1-2 против pN0	0,57	0,002	0,54	1,7 (1,2–2,5)	0,003
pN3 против pN0	1,33	<0,001	1,27	3,6 (2,5–5,1)	<0,001
Стандартная гастрэктомия, комбинированная гастрэктомия, комбинированная субтотальная резекция желудка против стандартной субтотальной резекции желудка	0,34	0,018	0,34	1,4 (1,1–1,8)	0,017
Хирургическое лечение против комплексного лечения (операция + перфузионная ИИТХТ)	0,48	0,009	0,45	1,6 (1,1–2,2)	0,012

Оценка ОР прогрессирования опухолевого процесса у радикально оперированных пациентов позволила установить факторы неблагоприятного прогноза, а именно:

1) метастатическое поражение регионарного лимфоколлектора в сочетании с инвазией первичной опухолью серозной оболочки увеличивает риск прогрессирования пропорционально количеству пораженных регионарных лимфоузлов: с увеличением их количества с pN1-2 до pN3 риск прогрессирования возрастает в 1,7–3,6 раза в сравнении с таковым у пациентов с pN0;

2) распространенный опухолевый процесс, требующий выполнения гастрэктомии (в стандартном или комбинированном варианте) или комбинированной субтотальной резекции желудка в сравнении со случаями, при которых достаточно выполнения стандартной дистальной субтотальной резекции желудка;

3) в случае, если объем лечебных мероприятий ограничивается только радикальным хирургическим лечением без перфузионной ИИТХТ, риск прогрессирования опухолевого процесса в отдаленные сроки после операции увеличивается в 1,6 раза.

Таким образом, наличие вышеперечисленных факторов риска прогрессирования, характеризующих распространенность опухолевого процесса (pN1-3), а также объем проведенного лечения (необходимость выполнения гастрэктомии или комбинированных операций), обуславливают недостаточную эффективность радикального хирургического лечения, особенно при отсутствии адьювантной терапии. Наибольший риск прогрессирования РЖ был отмечен при метастатическом поражении регионарного лимфоколлектора pN3 (ОР 3,6 (95 % ДИ 2,5–5,1), $p_{\text{Cox}} < 0,001$).

Оценка показателей ВСП в группах сравнения с учетом значения категории pN и объема проведенного лечения (стандартная или комбинированная операция с перфузионной ИИТХТ или без нее) продемонстрировала наилучшие ее показатели у пациентов с pN3 (табл. 3).

Таблица 3. Оценка ВСП на основе построенной модели в зависимости от варианта проведенного лечения у пациентов с различным pN

Table 3. Evaluation of the progression free survival based on the constructed model depending on the treatment option in the patients with different pN

pN	Тип операции	Вариант проведенного лечения	Выживаемость, свободная от прогрессирования		
			2-летняя	3-летняя	5-летняя
pN0	Гастрэктомия (стандартная, комбинированная)/комбинированная субтотальная резекция желудка	Хирургическое лечение	61,5 ± 8,1	52,6 ± 10,4	43,1 ± 13,4
pN1-2			43,3 ± 11,5	33,1 ± 14,9	23,4 ± 9,5
pN3			17,6 ± 21,1	10,1 ± 28,0	4,9 ± 37,9
pN0	Стандартная субтотальная резекция желудка		70,7 ± 6,4	63,2 ± 8,2	54,8 ± 10,6
pN1-2			55 ± 8,9	45,4 ± 11,4	35,5 ± 14,9
pN3			28,9 ± 19,0	19,4 ± 25,0	11,7 ± 33,4
pN0	Гастрэктомия (стандартная, комбинированная)/комбинированная субтотальная резекция желудка	Хирургическое лечение + перфузионная термохимиотерапия	73,4 ± 6,9	66,4 ± 9,0	58,5 ± 11,6
pN1-2			58,7 ± 10,9	49,4 ± 14,4	39,7 ± 18,7
pN3			33,1 ± 21,1	23,2 ± 28,0	14,7 ± 36,9
pN0	Стандартная субтотальная резекция желудка		80,2 ± 5,2	74,7 ± 6,7	68,2 ± 8,7
pN1-2			68,3 ± 8,0	60,5 ± 10,5	51,7 ± 13,6
pN3			45,4 ± 16,5	35,2 ± 21,9	25,4 ± 28,8

Данные, представленные в табл. 2, 3, позволяют рассматривать наличие массивного метастатического поражения регионарного лимфоколлектора pN3 в качестве инициального этапа системного прогрессирования РЖ, существенно ухудшающего его прогноз, несмотря на проведение перфузионной ИИТХТ. Последнее обосновывает целесообразность дополнения адьювантной ИИТХТ системной адьювантной полихимиотерапией (АПХТ) для предупреждения системного прогрессирования РЖ в случаях, классифицированных как pN3.

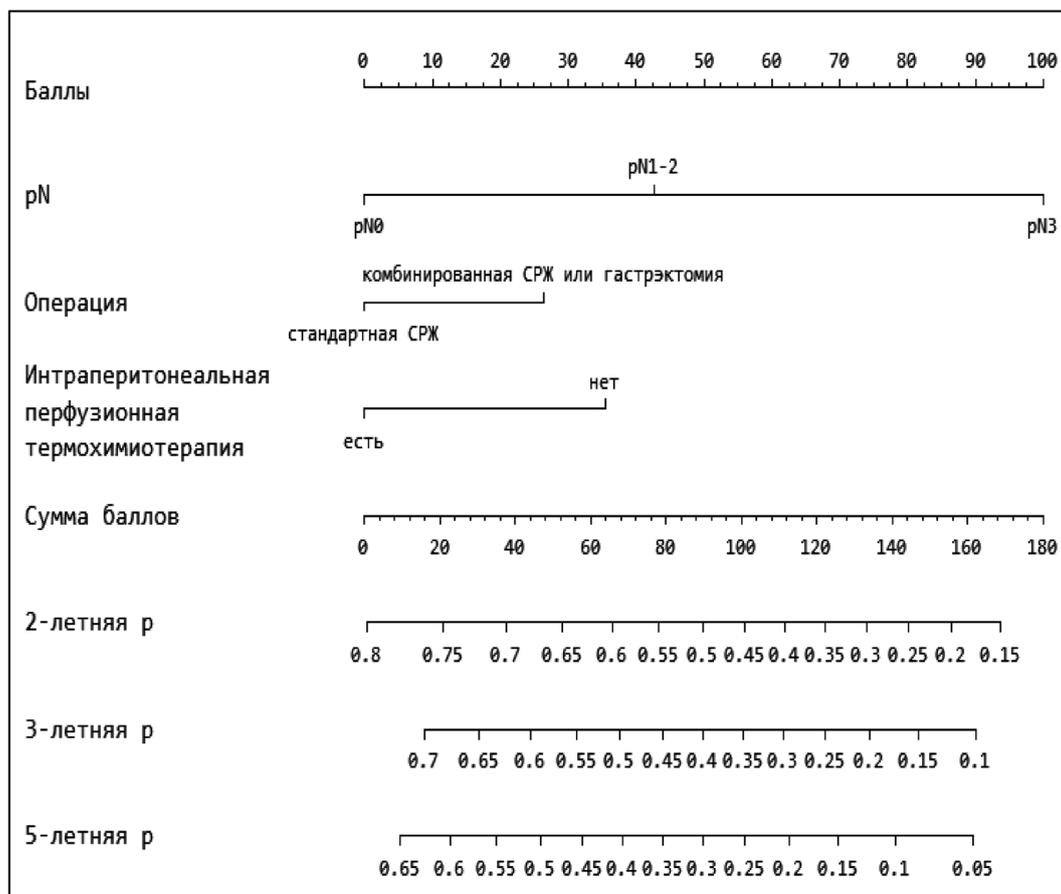
Для использования полученных результатов моделирования в клинической практике нами проведена оценка производительности разработанной модели (см. табл. 2). Результаты оценки производительности модели с помощью бутстреппинга с 5000 повторами представлены в табл. 4.

Представленные значения показателей производительности (индексы) свидетельствуют о приемлемой согласованности ($D_{ху}$ -статистика), удовлетворительной дискриминационной способности (индекс дискриминации D больше 0), согласии (индекс ненадежности U приближается к 0) разработанной модели прогнозирования ВСП. Значение калибровочного уклона (S), близкое к 1 (в нашем случае – 0,977), свидетельствует о приемлемом общем согласии между наблюдаемыми

Таблица 4. Показатели производительности модели прогнозирования прогрессирования опухолевого процесса у радикально оперированных пациентов

Table 4. Performance indicators of the model for predicting tumor progression in radically operated patients

Индекс	Индекс производительности модели			Разница в индексах тестового и обучающего набора (оптимизм)	Скорректированный индекс
	исходный	для обучающего набора	для тестового набора		
$D_{ху}$	0,327	0,327	0,320	0,006	0,320
D	0,029	0,030	0,028	0,002	0,027
U	-0,001	-0,001	0,001	-0,001	0,001
S	1,0	1,0	0,977	0,023	0,977



Номограмма, прогнозирующая выживаемость, свободную от прогрессирования. СРЖ – субтотальная резекция желудка
 Nomogram for predicting progression-free survival. Gastric cancer (СРЖ) – subtotal gastric resection

и прогнозируемыми рисками развития прогрессирования РЖ в отдаленные сроки после радикальной операции. Индекс конкордации составил 0,67.

В связи с необходимостью учета в практических условиях одновременно нескольких прогностических факторов, зачастую оказывающих различное влияние на продолжительность безрецидивного периода и показатели выживаемости, возникает необходимость персонализированного подхода к оценке прогноза клинического течения РЖ.

Для реализации данного подхода при оценке вероятности ВСП у пациентов с местнораспространенным раком желудка pT4a-b при различных вариантах противоопухолевого лечения разработана номограмма (см. рисунок).

Номограмма составлена с учетом независимых прогностических факторов, установленных при проведении многофакторного анализа (см. табл. 2). Каждому из использованных в номограмме факторов присвоено определенное количество баллов в соответствии с коэффициентом регрессии, а итоговая сумма баллов определяет ВСП после радикального хирургического лечения РЖ в сроки от 2 до 5 лет.

Преимуществом использования номограммы по сравнению с прочими методами количественного определения риска прогрессирования РЖ является возможность выполнения персонализированной прогностической оценки вместо простого отнесения пациента к одной из групп риска, на которые была разделена вся когорта обследованных в соответствии с имеющейся вероятностью развития прогрессирования РЖ. Данный подход позволяет индивидуально подойти к планированию объема лечебных мероприятий и кратности контрольных обследований в рамках диспансерного наблюдения после выполнения радикального хирургического лечения в зависимости от объема оперативного вмешательства и наличия или отсутствия адъювантной перфузионной ИИТХТ. Для иллюстрации этого положения приводим следующие клинические примеры.

Пример 1. Пациент С., 1942 г. рождения, амбулаторная карта № 7545/09, диагноз: язвенно-инfiltrативный рак тела желудка, pT4aN0M0, стадия IIb; 28.09.2009 пациенту проведено хирургическое лечение – гастрэктомия, лимфодиссекция D2. Адьювантное лечение не проводилось из-за отказа пациента. Определено: характер проведенной операции (стандартная гастрэктомия) – 28 баллов; гистологически степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN0) – 0 баллов; пациенту не была проведена интраперитонеальная химиотерапия – 35 баллов. Общая сумма баллов – 63. При данной сумме баллов прогнозируемая 2-летняя ВСП составляет 44 %, 3-летняя – 34, 5-летняя – 24 %. Прогрессирование опухолевого процесса с развитием метастатической перитонеальной диссеминации диагностировано через 668 дней после радикального хирургического лечения (28.09.2009), 13.04.2012 пациент умер от основного заболевания.

Пример 2. Пациент Т., 1957 г. рождения, амбулаторная карта № 832/14, диагноз: язвенно-инfiltrативный рак тела желудка, pT4aN0M0, стадия IIb; 29.10.2014 пациенту проведено хирургическое лечение – гастрэктомия, лимфодиссекция D2, перфузионная ИИТХТ (цисплатин, доксорубин при температуре 42 °С в течение 1 ч). Определено: характер проведенной операции (стандартная гастрэктомия) – 28 баллов; гистологически степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN0) – 0 баллов; пациенту проведена перфузионная ИИТХТ – 0 баллов. Общая сумма баллов – 28. При данной сумме баллов прогнозируемая 2-летняя ВСП составляет 76 %, 3-летняя – 68, 5-летняя – 58 %. На момент написания данной статьи пациент жив, признаки прогрессирования заболевания отсутствуют.

Таким образом, проведение адьювантной перфузионной ИИТХТ, несмотря на одинаковую степень распространенности опухолевого процесса, позволило предупредить прогрессирование РЖ и добиться ремиссии заболевания, улучшив, таким образом, прогноз рака желудка в отдаленные сроки после радикальной операции.

Наиболее неблагоприятную когорту пациентов составляют пациенты с массивным метастатическим поражением регионарного лимфоколлектора, когда количество метастазов в регионарных лимфоузлах составляет 7 и более (pN3). У данной категории пациентов прогрессирование РЖ, несмотря на комбинированный и комплексный характер проведенного лечения, развивается не как исключение, а как правило [10]. Для иллюстрации приводим следующее клиническое наблюдение.

Пример 3. Пациент Л., 1955 г. рождения, амбулаторная карта № 621/10, диагноз: язвенно-инfiltrативный рак антрального отдела желудка, pT4aN3M0, стадия IIb; 24.02.2010 пациенту проведено хирургическое лечение – дистальная субтотальная резекция желудка, лимфодиссекция D2, перфузионная ИИТХТ (цисплатин, доксорубин при температуре 42 °С в течение 1 ч). Определено: характер проведенной операции (стандартная дистальная субтотальная резекция желудка) – 0 баллов; гистологически степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN3) – 100 баллов; пациенту проведена интраперитонеальная химиотерапия – 0 баллов. Общая сумма баллов – 100. При данной сумме баллов прогнозируемая 2-летняя ВСП составляет 45 %, 3-летняя – 35, 5-летняя – 25 %. Прогрессирование опухолевого процесса с развитием метастазов в парааортальных лимфоузлах отмечено через 1462 дня после операции (24.02.2014), 19.07.2014 пациент умер от основного заболевания.

Проведение комплексного лечения в случае массивного метастатического поражения регионарного лимфоколлектора не позволило предупредить прогрессирование опухолевого процесса, что обусловлено возможным наличием субклинических отдаленных лимфогематогенных метастазов как проявление инициальных этапов системного прогрессирования РЖ. Проведение перфузионной ИИТХТ в данной ситуации не может оказать влияния на отдаленные результаты лечения из-за преимущественно регионарного эффекта последней [11], что диктует целесообразность ее комбинации с системной АПХТ [2]. Для иллюстрации данного положения приводим следующее клиническое наблюдение.

Пример 4. Пациент Н., 1953 г. рождения, амбулаторная карта № 07905/15, диагноз: язвенно-инfiltrативный рак нижней трети тела и антрального отдела желудка, pT4aN3M0, стадия IIIa; 14.10.2015 пациенту выполнена дистальная субтотальная резекция желудка, лимфодиссекция D2, перфузионная ИИТХТ (цисплатин, доксорубин при температуре 42 °С в течение 1 ч), в послеоперационном периоде 8 курсов АПХТ (оксалиплатин, капецитабин). Определено: характер

проведенной операции (стандартная дистальная субтотальная резекция желудка) – 0 баллов; гистологически степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN3) – 100 баллов; пациенту проведена интраперитонеальная химиотерапия – 0 баллов. Общая сумма баллов – 100. При данной сумме баллов прогнозируемая 2-летняя ВСП составляет 45 %, 3-летняя – 35, 5-летняя – 25 % (так же, как и в предыдущем примере). На момент написания данной статьи пациент жив, признаки прогрессирования заболевания отсутствуют.

Несмотря на одинаковое количество баллов, определенное по номограмме в последних двух наблюдениях (100 баллов), и одинаковые значения показателей ВСП в примерах № 3 и № 4, предотвратить прогрессирование РЖ удалось благодаря 8 курсам АПХТ в дополнение к комплексному лечению. Таким образом, у пациентов с множественными метастазами в регионарных лимфоузлах (pN3) целесообразно проведение комплексного лечения, включающего помимо радикальной операции перфузионную ИИТХТ в сочетании с послеоперационной АПХТ.

Таким образом, результаты проведенного исследования подчеркивают важность проведения адьювантного лечения у пациентов с местнораспространенным РЖ, при этом обязательным компонентом такого лечения у пациентов с высоким риском имплантационного метастазирования (III–IV тип по Borrmann, pT4a-bN0-3M0) должна быть перфузионная ИИТХТ, которая позволяет предупредить прогрессирование РЖ после радикального хирургического лечения. В случае массивного метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN3) целесообразно дополнить вышеупомянутое комплексное лечение 7–8 курсами системной АПХТ.

Обсуждение. Радикальное хирургическое лечение составляет основу лечебных мероприятий при местнораспространенном РЖ pT4a-bN0-3M0 [12]. Тем не менее у более чем 50 % пациентов с ПВ–ПС стадией РЖ в отдаленные сроки после радикальной операции отмечается прогрессирование опухолевого процесса [10, 13]. С одной стороны, это свидетельствует о недостаточной эффективности радикального хирургического лечения для предупреждения прогрессирования РЖ, с другой – о необходимости индивидуального подхода к прогнозированию клинического течения РЖ после проведенного оперативного вмешательства, основанного на использовании прогностических моделей, учитывающих не только клинико-морфологические особенности опухолевого процесса (например, описываемые классификацией pTNM (American Joint Committee on Cancer – AJCC)), но и объем хирургического и адьювантного лечения.

В ряде исследований продемонстрировано, что проведение перфузионной ИИТХТ позволяет улучшить отдаленные результаты лечения радикально оперированных пациентов с pT4a-b, в частности увеличить ВСП [2, 10, 14–16]. Из этого следует, что факт проведения адьювантной ИИТХТ обязательно должен быть принят во внимание при прогнозировании результатов лечения РЖ pT4a-b, как это было выполнено в работе J. Lu с соавт. [17].

Положительное влияние адьювантной ИИТХТ на прогноз РЖ было продемонстрировано нами при проведении многофакторного анализа. В частности, было отмечено увеличение риска прогрессирования РЖ при отсутствии адьювантной ИИТХТ у радикально оперированных по поводу РЖ пациентов (III–IV тип по Borrmann, pT4a-bN0-3M0) (ОР 1,6 (95 % ДИ 1,1–2,2), $p_{\text{Cox}} = 0,012$). Это было учтено при разработке предлагаемой прогностической модели и отличает ее от аналогов, ранее опубликованных в литературе [18–20]. Кроме этого, важной для прогнозирования ВСП является информация об особенностях проведенного оперативного вмешательства (стандартная или комбинированная операция, субтотальная резекция желудка или гастрэктомия), поскольку косвенно это свидетельствует о распространенности первичной опухоли по стенке желудка (вовлечение, например, тела и антрального отдела) и о переходе опухоли на соседние структуры (pT4b). Очевидно, в процессе выполнения комбинированных мультиорганных резекций (а также в дооперационном периоде) происходит интенсивная диссеминация опухолевых клеток в брюшной полости, что определяет неблагоприятный прогноз течения РЖ. С другой стороны, выполнение субтотальной резекции желудка возможно при небольших опухолях (до 2–3 см), располагающихся в дистальной или проксимальной частях желудка, в то время как более распространенный опухолевый процесс требует выполнения гастрэктомии, что несомненно негативно сказывается на продолжительности безрецидивного периода. Данный факт не нашел отражения ни в одной из прогностических моделей, предложенных к настоящему времени, и не описывается категорией pT классифи-

кации рTNM (AJCC), что свидетельствует о несомненном преимуществе разработанной номограммы перед существующими аналогами [17, 18, 21, 22]. Кроме этого, фактором, способствующим интраоперационной диссеминации опухолевых клеток, помимо инвазии первичной опухолью серозной оболочки является метастатическое поражение регионарных лимфоузлов [23]. При этом, как ранее было продемонстрировано в ряде публикаций, в случае массивного метастатического поражения регионарного лимфоколлектора рN3 выполнение адьювантной интраперитонеальной химиотерапии в ряде случаев неспособно кардинально повлиять на прогноз РЖ [15, 24]. Результаты проведенного нами многофакторного анализа подтвердили факт неблагоприятного влияния метастатического поражения регионарных лимфоузлов на прогрессирование РЖ, обосновав необходимость включения данного признака в предлагаемую номограмму.

Таким образом, разработанная номограмма позволяет более точно в сравнении с широко применяемой в рутинной клинической практике классификацией TNM (AJCC) прогнозировать клиническое течение РЖ рT4a-b за счет учета не только степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (рN1-3), но и особенностей проведенного противоопухолевого лечения (объем перенесенной операции, наличие или отсутствие перфузионной ИИТХТ). В случае массивного метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (рN3) программа адьювантного лечения РЖ помимо периоперационной ПХТ или адьювантной системной ПХТ (что предусмотрено современной стратегией лечения местнораспространенного РЖ) должна включать перфузионную термохимиотерапию, особенно у пациентов с инфильтративными формами роста первичной опухоли.

Выводы

1. После радикального хирургического лечения пациентов с язвенно-инфильтративным и диффузно-инфильтративным РЖ риск прогрессирования опухолевого процесса увеличивается в следующих случаях: а) при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах, при этом увеличение ОР прогрессирования происходит пропорционально увеличению степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (рN1-2 – ОР 1,7 (95 % ДИ 1,2–2,5), $p_{\text{Cox}} = 0,003$; рN3 – ОР 3,6 (95 % ДИ 2,5–5,1), $p_{\text{Cox}} < 0,001$); б) когда степень распространенности опухолевого процесса требует выполнения гастрэктомии (в стандартном или комбинированном варианте) или комбинированной дистальной резекции желудка (ОР 1,4 (95 % ДИ 1,1–1,8), $p_{\text{Cox}} = 0,017$); в) когда объем лечебных мероприятий ограничен только радикальным хирургическим лечением (ОР 1,6 (95 % ДИ 1,1–2,2), $p_{\text{Cox}} = 0,012$).

2. Разработанная номограмма, позволяющая прогнозировать выживаемость, свободную от прогрессирования, у радикально оперированных по поводу рака желудка пациентов не только на основании оценки степени распространенности опухолевого процесса (рN), но и с учетом проведенного интраоперационно объема противоопухолевого лечения, может помочь в планировании послеоперационного противоопухолевого лечения и обследования рассматриваемой категории пациентов в рамках диспансерного наблюдения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Океанов, А. Е. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2004–2013) / А. Е. Океанов, П. И. Моисеев, Л. Ф. Левин. – Минск : Респ. науч.-практ. центр онкологии и мед. радиологии, 2018. – 286 с.
2. Reutovich, M. Y. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in prevention of gastric cancer metachronous peritoneal metastases: a systematic review / M. Y. Reutovich, O. V. Krasko, O. G. Sukonko // J. Gastrointest. Oncol. – 2021. – Vol. 12, suppl. 1. – P. S5–S17. <http://doi.org/10.21037/jgo-20-129>
3. Matharu, G. Systematic review of intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer / G. Matharu, O. Tucker, D. Alderson // Brit. J. Surg. – 2011. – Vol. 98, N 9. – P. 1225–1235. <http://doi.org/10.1002/bjs.7586>
4. Разработка и валидация номограммы, позволяющей прогнозировать выживаемость без прогрессирования при терапии пазопанибом по поводу распространенного рака почки / M. W. Kattan [et al.] // Онкоурология. – 2015. – Т. 11, № 4. – С. 16–23.
5. Therneau, T. Modeling survival data: extending the Cox model / T. Therneau, P. Grambsch. – New York : Springer-Verlag, 2000. – 350 p.
6. Harrell, F. E. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors / F. E. Harrell, K. L. Lee, D. B. Mark // Stat. Med. – 1996. – Vol. 15, N 4. – P. 361–387. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19960229\)15:4<361::AID-SIM168>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19960229)15:4<361::AID-SIM168>3.0.CO;2-4)

7. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. – Mode of access : <http://www.R-project.org/>. – Date of access : 21.01.2021.
8. Therneau T. (2015). *_A Package for Survival Analysis in S_*. version 2.38. – Mode of access : <https://CRAN.R-project.org/package=survival>>. – Date of access : 21.01.2021.
9. Harrell, F. E. (Jr.). *rms: Regression Modeling Strategies*. R package version 5.1-4. – Mode of access : <https://CRAN.R-project.org/package=rms>. – Date of access : 21.01.2021.
10. Reutovich, M. Yu. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in serosa-invasive gastric cancer patients / M. Yu. Reutovich, O. V. Krasko, O. G. Sukonko // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2019. – Vol. 45, N 12. – P. 2405–2411. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2019.07.030>
11. Intraperitoneal chemotherapy in advanced gastric cancer. Meta-analysis of randomized trials / F. Coccolini [et al.] // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2014. – Vol. 40, N 1. – P. 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2013.10.019>
12. Treatment of resectable gastric cancer / J. L. Dikken [et al.] // *Ther. Adv. Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 5, N 1. – P. 49–69. <https://doi.org/10.1177/1756283X11410771>
13. Prediction of recurrence after radical surgery for gastric cancer: a scoring system obtained from a prospective multicenter study / D. Marrelli [et al.] // *Ann. Surg.* – 2005. – Vol. 241, N 2. – P. 247–255. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000152019.14741.97>
14. Prophylactic HIPEC with radical D2 gastrectomy improves survival and peritoneal recurrence rates for locally advanced gastric cancer: personal experience from a randomized case control study / M. K. Beeharry [et al.] // *BMC Cancer.* – 2019. – Vol. 19. – Art. 932. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6125-z>
15. Comparison different methods of intraoperative and intraperitoneal chemotherapy for patients with gastric cancer: a meta-analysis / J. Y. Huang [et al.] // *Asian Pacific J. Cancer Prevent.* – 2012. – Vol. 13, N 9. – P. 4379–4385. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.9.4379>
16. Phase II trial of prophylactic hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with locally advanced gastric cancer after curative surgery / B. Fan [et al.] // *BMC Cancer.* – 2021. – Vol. 21. – P. 216. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07925-2>
17. Development and external validation of a nomogram to predict recurrence-free survival after r0 resection for stage II/III gastric cancer: an international multicenter study / J. Lu [et al.] // *Front. Oncol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 574611. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.574611>
18. Prediction of conditional probability of survival after surgery for gastric cancer: a study based on eastern and Western large data sets / Q. Zhong [et al.] // *Surgery.* – 2018. – Vol. 163, N 6. – P. 1307–1316. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.02.011>
19. Nomogram predicting long-term survival after D2 gastrectomy for gastric cancer / D.-S. Han [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 3834–3840. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.41.8343>
20. A nomogram for predicting individual survival of patients with gastric cancer who underwent radical surgery with extended lymph node dissection / K. Y. Song [et al.] // *Gastric Cancer.* – 2014. – Vol. 17, N 2. – P. 287–293. <https://doi.org/10.1007/s10120-013-0270-x>
21. Nomogram for predicting the survival of gastric adenocarcinoma patients who receive surgery and chemotherapy / C. Y. Wang [et al.] // *BMC Cancer.* – 2020. – Vol. 20. – Art. 10. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6495-2>
22. A nomogram to predict overall survival and disease-free survival after curative resection of gastric adenocarcinoma / Y. Kim [et al.] // *Ann. Surg. Oncol.* – 2015. – Vol. 22. – P. 1828–1835. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4230-4>
23. Mechanisms of peritoneal metastasis after operation for non-serosa invasive gastric carcinoma: an ultrarapid detection system for intraperitoneal free cancer cells and a prophylactic strategy for peritoneal metastasis / T. Marutsuka [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9, N 2. – P. 678–685.
24. Kim, J.-I. A controlled clinical study of serosa-invasive gastric carcinoma patients who underwent surgery plus intraoperative hyperthermo-chemo-perfusion (IHCP) / J.-I. Kim, H.-S. Bae // *Gastric Cancer.* – 2001. – Vol. 4, N 1. – P. 27–33. <https://doi.org/10.1007/s101200100013>

References

1. Okeanov A. E., Moiseev P. I., Levin L. F. Statistics of cancer diseases in the Republic of Belarus (2004–2013). Minsk, Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology, 2018. 286 p. (in Russian).
2. Reutovich M. Y., Krasko O. V., Sukonko O. G. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in prevention of gastric cancer metachronous peritoneal metastases: a systematic review. *Journal of Gastrointestinal. Oncology*, 2021, vol. 12, suppl. 1, pp. S5–S17. <https://doi.org/10.21037/jgo-20-129>
3. Matharu G., Tucker O., Alderson D. Systematic review of intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer. *British Journal of Surgery*, 2011, vol. 98, no. 9, pp. 1225–1235. <http://doi.org/10.1002/bjs.7586>
4. Kattan M. W., Sternberg C. N., Mehmud F., Bhatt K., McCann L., Motzer R. J. Development and validation of a prognostic nomogram for progression-free survival in patients with advanced renal cell carcinoma treated with pazopanib. *Onkourologiya = Cancer urology*, 2015, vol. 11, no. 4, pp. 16–23 (in Russian).
5. Therneau T., Grambsch P. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. New York, Springer-Verlag, 2000. 350 p.
6. Harrell F. E., Lee K. L., Mark D. B. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Statistics in Medicine*, 1996, vol. 15, no. 4, pp. 361–387. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19960229\)15:4<361::AID-SIM168>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19960229)15:4<361::AID-SIM168>3.0.CO;2-4)
7. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org/> (accessed 21.01.2021).
8. Therneau T (2015). *_A Package for Survival Analysis in S_*. version 2.38. Available at : <https://CRAN.R-project.org/package=survival>> (accessed 21.01.2021).
9. Harrell F. E. (Jr.). *rms: Regression Modeling Strategies*. R package version 5.1-4. Available at : <https://CRAN.R-project.org/package=rms> (accessed 21.01.2021).

10. Reutovich M. Yu., Krasko O. V., Sukonko O. G. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in serosa-invasive gastric cancer patients. *European Journal of Surgical Oncology*, 2019 vol. 45, no. 12, pp. 2405–2411. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2019.07.030>
11. Cocolini F., Cotte E., Glehen O., Lotti M., Poiasina E., Catena F., Yonemura Y., Ansaloni L. Intraperitoneal chemotherapy in advanced gastric cancer. Meta-analysis of randomized trials. *European Journal of Surgical Oncology*, 2014, vol. 40, no. 1, pp. 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2013.10.019>
12. Dikken J. L., van de Velde C. J., Coit D. G., Shah M. A., Verheij M., Cats A. Treatment of resectable gastric cancer. *Therapeutics Advances Gastroenterology*, 2012, vol. 5, no. 1, pp. 49–69. <https://doi.org/10.1177/1756283X11410771>
13. Marrelli D., de Stefano A., de Manzoni G., Morgagni P., Di Leo A., Roviello F. Prediction of recurrence after radical surgery for gastric cancer: a scoring system obtained from a prospective multicenter study. *Annals of Surgery*, 2005, vol. 241, no. 2, pp. 247–255. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000152019.14741.97>
14. Beechary M. K., Zhu Z. L., Liu W. T., Yao X. X., Yan M., Zhu Z. G. Prophylactic HIPEC with radical D2 gastrectomy improves survival and peritoneal recurrence rates for locally advanced gastric cancer: personal experience from a randomized case control study. *BMC Cancer*, 2019, vol. 19, art. 932. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6125-z>
15. Huang J. Y., Xu Y. Y., Sun Z., Zhu Z., Song Y. X., Guo P. T., You Y., Xu H. M. Comparison different methods of intraoperative and intraperitoneal chemotherapy for patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2012, vol. 13, no. 9, pp. 4379–4385. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.9.4379>
16. Fan B., Bu Zh., Zhang J., Zong X., Ji X., Fu T., Jia Z., Zhang Y., Wu X. Phase II trial of prophylactic hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with locally advanced gastric cancer after curative surgery. *BMC Cancer*, 2021, vol. 21, p. 216. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07925-2>
17. Lu J., Xu B. B., Zheng C. H., Li P., Xie J. W., Wang J. B., Lin J. X., Chen Q. Y., Truty M. J., Huang C. M. Development and external validation of a nomogram to predict recurrence-free survival after R0 resection for stage II/III gastric cancer: an international multicenter study. *Frontiers in Oncology*, 2020, vol. 22, no. 10, p. 574611. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.574611>
18. Zhong Q., Chen Q. Y., Li P., Xie J. W., Wang J. B., Lin J. X. [et al.]. Prediction of conditional probability of survival after surgery for gastric Cancer: a study based on eastern and Western large data sets. *Surgery*, 2018, vol. 163, no. 6, pp. 1307–1316. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.02.011>
19. Han D.-S., Suh Y.-S., Kong S.-H., Lee H.-J., Choi Y., Aikou S., Sano T., Park B.-J., Kim W.-H., Yang H.-K. Nomogram predicting long-term survival after D2 gastrectomy for gastric cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, vol. 30, pp. 3834–3840. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.41.8343>
20. Song K. Y., Park Y. G., Jeon H. M., Park C. H. A nomogram for predicting individual survival of patients with gastric cancer who underwent radical surgery with extended lymph node dissection. *Gastric Cancer*, 2014, vol. 17, no. 2, pp. 287–293. <https://doi.org/10.1007/s10120-013-0270-x>
21. Wang Ch.-Y., Yang J., Zi H., Zheng Zh.-L., Li B.-H., Wang Y. [et al.]. Nomogram for predicting the survival of gastric adenocarcinoma patients who receive surgery and chemotherapy. *BMC Cancer*, 2020, vol. 20, art. 10. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6495-2>
22. Kim Y., Spolverato G., Ejaz A., Squires M. H., Poultides G., Fields R. C. [et al.]. A nomogram to predict overall survival and disease-free survival after curative resection of gastric adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 2015, vol. 22, pp. 1828–1835. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4230-4>
23. Marutsuka T., Shimada S., Shiomori K., Hayashi N., Yagi Y., Yamane T., Ogawa M. Mechanisms of peritoneal metastasis after operation for non-serosa invasive gastric carcinoma: an ultrarapid detection system for intraperitoneal free cancer cells and a prophylactic strategy for peritoneal metastasis. *Clinical Cancer Research*, 2003, vol. 9, no. 2, pp. 678–685.
24. Kim J.-I., Bae H.-S. A controlled clinical study of serosa-invasive gastric carcinoma patients who underwent surgery plus intraoperative hyperthermo-chemo-perfusion (IHCP). *Gastric Cancer*, 2001, vol. 4, no. 1, pp. 27–33.

Інфармацыя аб аўтарах

Ревтовіч Міхаіл Юр'евіч – д-р мед. навук, доцент. Беларуская медыцынская акадэмія паследипломнага адукацыі (ул. П. Бровкі, 3/3, 220013, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: mihail_revtovich@yahoo.com

Красько Ольга Владимировна – канд. тэхн. навук, доцент, вед. науч. супрацоўнік. Аб'яднаны інстытут праблем інфарматыкі НАН Беларусі (ул. Сурганова, 6, 220012, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: krasko@newman.bas-net.by

Малькевіч Віктар Тихонавіч – д-р мед. навук, доцент, заведуючы лабараторыяй. Рэспубліканскі навучна-практычны цэнтр онкалогіі і медыцынскай радыялогіі ім. Н. Н. Аляксандрава (223040, а/г Лесной, Мінскі р-н, Рэспубліка Беларусь). E-mail: malkvt@mail.ru

Патейка Аляксандр Іванавіч – торакальны хірург. Рэспубліканскі навучна-практычны цэнтр онкалогіі і медыцынскай радыялогіі ім. Н. Н. Аляксандрава (223040, а/г Лесной, Мінскі р-н, Рэспубліка Беларусь). E-mail: drpatsejka@gmail.com

Information about the authors

Mikhail Yu. Reutovich – D. Sc. (Med.), Associate Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mihail_revtovich@yahoo.com

Volha V. Krasko – Ph. D. (Eng.), Associate Professor, Leading Researcher. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: krasko@newman.bas-net.by

Victor T. Malkevich – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Head of the Laboratory. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: malkvt@mail.ru

Aliaksandr I. Patsejka – thoracic surgeon. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: drpatsejka@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.127-005.8:616.153

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-38-47>

Поступила в редакцию 14.09.2021

Received 14.09.2021

**Н. В. Нарыжная¹, С. В. Логвинов^{1,2}, Б. К. Курбатов¹, А. В. Мухомедзянов¹,
М. А. Сиротина¹, С. Н. Чепелев³, Ф. И. Висмонт³, Л. Н. Маслов¹**

¹Научно-исследовательский институт кардиологии

Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск, Российская Федерация

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Российская Федерация

³Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ МИОКАРДА У КРЫС С ИНДУЦИРОВАННЫМ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ ЗАВИСИТ ОТ УРОВНЯ ЛЕПТИНА

Аннотация. Дистантное посткондиционирование (ДПост) имеет большой терапевтический потенциал в плане защиты миокарда при ишемии-реперфузии. При этом при наличии у пациента метаболических нарушений клиническое применение кондиционирующих воздействий ограничено.

Цель настоящей работы – оценить влияние индуцированного метаболического синдрома (иMetС) на инфаркт-лимитирующий эффект дистантного ишемического посткондиционирования у крыс и изучить механизмы этого влияния.

Исследование проведено на крысах линии Вистар. Для индуцирования метаболического синдрома (MetС) крыс содержали на высокоуглеводной высокожировой диете. Критериями развития MetС считали увеличение массы животного, объема абдоминального жира, развитие артериальной гипертензии, гиперхолестеринемии, гиперлептинемии, гипергликемии, повышение содержания триглицеридов в сыворотке крови, развитие состояния инсулинорезистентности по значимому повышению индекса Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (НОМА-IR) и нарушение толерантности к глюкозе. Всем животным моделировали 45-минутную коронароокклюзию и 120-минутную реперфузию.

ДПост приводило к двукратному сокращению размера инфаркта у крыс с интактным метаболизмом ($p < 0,0001$), в то время как у крыс с иMetС уменьшение размера инфаркта при ДПост составило 25 % ($p = 0,00003$), что было значимо ниже, чем у животных без иMetС ($p < 0,0001$). Выявлена прямая корреляционная зависимость размера инфаркта при ДПост от содержания лептина в сыворотке крови крыс с иMetС.

Анализ полученных данных позволяет сделать предположение о том, что снижение эффективности ДПост у крыс с индуцированным диетой MetС зависит от содержания лептина в крови.

Ключевые слова: дистантное посткондиционирование, метаболический синдром, миокард, ишемия, реперфузия, артериальное давление, лептин, глюкоза, триглицериды, инсулин

Для цитирования: Эффективность дистантного ишемического посткондиционирования миокарда у крыс с индуцированным метаболическим синдромом зависит от уровня лептина / Н. В. Нарыжная [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 38–47. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-38-47>

**Natalia V. Naryzhnaya¹, Sergey V. Logvinov^{1,2}, Boris K. Kurbatov¹, Alexandr V. Mukhomedzyanov¹,
Maria A. Sirotina¹, Sergey N. Chepelev³, Frantishek I. Vismont³, Leonid N. Maslov¹**

¹Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,
Tomsk, Russian Federation

²Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

THE EFFICIENCY OF REMOTE ISCHEMIC POSTCONDITIONING OF THE MYOCARDIUM IN RATS WITH INDUCED METABOLIC SYNDROME DEPENDS ON THE LEPTIN LEVEL

Abstract. Remote postconditioning (RPost) has a great therapeutic potential for protecting the myocardium during ischemia-reperfusion in clinical practice. At the same time, an important problem limiting the use of conditioning effects in the clinic is the presence of metabolic disorders in the patient. The aim of this work was to assess the effect of induced metabolic syndrome (iMetS) on the efficacy of the infarct-limiting effect of remote ischemic postconditioning (RPost) in rats and to study the mechanisms of this effect.

The study was carried out on Wistar rats. MetS was induced by high-carbohydrate high-fat diet. Criteria of metabolic syndrome were an increase in the weight of animals, abdominal fat volume, the development of arterial hypertension, hypercholesterolemia, an increase in triglycerides in serum, hyperleptinemia, hyperglycemia, the development of a state of insulin resistance by a significant increase in the Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) index and glucose tolerance. All animals were subjected to 45 min coronary occlusion and 120 min reperfusion.

RPost led to a twofold reduction of infarct size in rats with intact metabolism ($p < 0.0001$), while in rats with iMetS a decrease in infarct size during RPost was 25 % ($p = 0.00003$), which was significantly lower than in animals without iMetC ($p < 0.0001$). A direct correlation was found between of infarct size during RPost and the serum leptin level of rats with iMetC.

The presented data suggested that a decrease in the efficiency of remote postconditioning in rats with diet-induced metabolic syndrome depends on leptin content in blood.

Keywords: distant postconditioning, metabolic syndrome, myocardium, ischemia, reperfusion, arterial pressure, leptin, glucose, triacyl glyceride, insulin

For citation: Naryzhnaya N. V., Logvinov S. V., Kurbatov B. K., Mukhomedzyanov A. V., Sirotina M. A., Chepelev S. N., Vismont F. I., Maslov L. N. The efficiency of remote ischemic postconditioning of the myocardium in rats with induced metabolic syndrome depends on the leptin level. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 38–47 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-38-47>

Введение. Несмотря на значительные успехи современной кардиологии и снижение смертности от острого инфаркта миокарда, ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда является основной причиной смерти пациентов и развития жизнеугрожающих осложнений при этом состоянии [1]. В настоящее время единственным эффективным методом лечения острого инфаркта миокарда является реканализация инфаркт-связанной коронарной артерии, что достигается с помощью тромболизиса или чрескожного коронарного вмешательства. При этом реперфузия миокарда при проведении фармакологической или хирургической реваскуляризации вносит существенный вклад в его повреждение [2]. Вместе с тем в клинической практике отсутствуют препараты, способные с высокой эффективностью предупредить возникновение реперфузионных повреждений.

Существующие стратегии защиты сердца от повреждения при ишемии и реперфузии, называемые кондиционированием, основаны на стимулировании механизмов неспецифической адаптационной защиты миокарда. Это методики локального кондиционирования миокарда, которые включают одно или несколько коротких циклов краткосрочной ишемии и реперфузии до ишемического события (ишемического прекондиционирования, ИПре) или в начале реперфузии (ишемическое посткондиционирование) [3], и методы дистантного кондиционирования, которые воспроизводятся ишемией удаленного органа (например, конечности) до или после острой ишемии миокарда [4]. Наибольший терапевтический потенциал для клинической практики представляет феномен дистантного посткондиционирования (ДПост) [5]. Так, снижение размера инфаркта при экспериментальной коронароокклюзии-реперфузии под влиянием ДПост достигает 50 % [6]. Основным преимуществом ДПост по сравнению с локальным является его малая инвазивность, отсутствие риска аритмий, эффективность и простота воспроизведения [5].

Вместе с тем трансляция экспериментальных результатов в клиническую практику требует изучения эффективности этих воздействий в условиях, приближенных к реальным. Существенной проблемой, ограничивающей применение кондиционирующих воздействий, является наличие у пациента метаболических нарушений, таких как гиперлипидемия, гипергликемия, которые в совокупности с артериальной гипертонией, инсулинорезистентностью и рядом других факторов составляют симптомокомплекс, называемый в современной медицине метаболическим синдромом (MetC). Наличие MetC (как всех его факторов в совокупности, так и каждого в отдельности) увеличивает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и смертности от них [7]. При применении ДПост как эффективной кардиозащитной стратегии важно определить, оказывает ли ДПост инфаркт-лимитирующий эффект при наличии MetC, который часто сопутствует ишемической болезни сердца. В последние годы широко исследуется эффективность разного рода кондиционирующих воздействий при диабете и MetC, однако данные об этом противоречивы. Было показано, что сопутствующие заболевания (в частности, сахарный диабет, гиперлипидемия) изменяют кардиозащитные эффекты различных кондиционирующих стимулов [8, 9]; ИПре и посткондиционирование, осуществляемые путем пережатия коронарной артерии до или после периода ишемии, не эффективны при гиперлипидемии, гипергликемии или гиперхолестеринемии [3, 10]; гипергликемия ухудшает кардиопroteкцию с помощью дистантного прекондиционирования [11]. У мышей со стрептозотоцин-индуцированным диабетом не наблюдается инфаркт-лимитирующего эффекта ДПост [9]. В клиническом исследовании Verouhis с соавт. [12] не обнаружена эффективность прекондиционирования у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST. Важно

отметить, что более чем у половины включенных в исследование имели место дислипидемия, гипергликемия или подтвержденный сахарный диабет [12]. Однако некоторые исследования показывают, что у мышей линии ObOb (сахарный диабет второго типа) и линии DKO (MetC) инфаркт-лимитирующий эффект ишемического посткондиционирования практически такой же, как у обычных мышей [13]. Эффективность ДПост при MetC, вызванном высококалорийной диетой, ранее не исследована. Работы, в которых сопоставлялась бы выраженность метаболических нарушений с эффективностью ДПост, ранее не проводились.

Цель настоящей работы – оценить влияние индуцированного метаболического синдрома на эффективность дистантного ишемического посткондиционирования у крыс и изучить механизмы этого влияния.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на 37 крысах линии Вистар. При работе с животными руководствовались требованиями приказа от 12 августа 1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» и приказа № 742 от 13.11.84 «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», а также Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 201 от 30 июня 2020 г.).

Животные были разделены на две группы. Исходные массы крыс обеих групп были равны, отклонение от средней массы в группе составляло не более 10 %. Крыс первой группы содержали на стандартной для лабораторных животных диете со свободным доступе к питьевой воде. Животные второй группы (индуцированный MetC – иMetC) получали в течение 90 сут высокоуглеводную высокожировую диету (ВУВЖД) и 20 %-ный раствор фруктозы вместо питьевой воды. Состав корма для ВУВЖД (%): белки – 16, жиры – 21, углеводы – 46 (в том числе фруктоза – 17), холестерин – 0,125, холиевая кислота – 0,5 [14]. После окончания ВУВЖД животных содержали в течение 1 недели на стандартной диете и обычной питьевой воде, чтобы исключить осмотический компонент повышения артериального давления из-за потребления фруктозы. Критериями развития MetC считали увеличение массы животного, объема абдоминального жира, содержания триглицеридов в сыворотке крови, развитие артериальной гипертензии, гиперхолестеринемии, гипергликемии, формирование инсулинорезистентности по значимому повышению индекса Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (НОМА-IR) и нарушение толерантности к глюкозе. Измерение давления проводили неинвазивным методом объемной плетизмографии на хвосте с помощью прибора MP35 с приставкой для измерения давления NIBP200A (Biopac System Inc., Goleta, США). Глюкозотолерантный тест (ГТТ) проводили стандартным методом: внутривенно вводили 2 г/кг глюкозы в виде 20 %-ного водного раствора, затем через 15, 30, 60, 90, 120 мин производили забор проб крови из ранки на кончике хвоста и с помощью наборов «Глюкоза-Ново В-8054», «Вектор-бест» (Россия) определяли в них содержание глюкозы. Вычисляли площадь под кривой (AUC).

Инфаркт-лимитирующий эффект ДПост исследовали на модели 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии *in vivo*. Животные были наркотизированы α -хлоралозой (60 мг/кг) и подключены к аппарату искусственной вентиляции легких SAR-830/P (CWE, Inc., Ardmore, PA19003, США). Животным проводили торакотомию на уровне 2–3-го ребер и перевязывали левую коронарную артерию на несколько миллиметров ниже ее выхода из аорты [15]. Через 45 мин после начала ишемии проводили снятие лигатуры и возобновление коронарного кровотока. Продолжительность следующей за этим реперфузии составляла 120 мин.

ДПост моделировали путем наложения жгутов на задние конечности в области тазобедренного сустава сразу после восстановления коронарного кровотока. Время ишемии и реперфузии для каждой фазы составляло по 5 мин. Протокол исследования ДПост включал три цикла ишемии-реперфузии.

После окончания реперфузии забранные из наружной сонной артерии образцы крови центрифугировали при 3000 об/мин, а отобранную сыворотку крови хранили при -70 °С до определения. Миокард извлекали из грудной клетки и промывали через аорту физиологическим раствором. Для выявления зоны риска лигатуру, наложенную ранее на левую коронарную артерию, вновь за-

тягивали и в аорту вводили 5 %-ный раствор перманганата калия. Таким образом, участок миокарда, не подвергшийся ишемии, прокрашивался, а непрокрашенный участок миокарда являлся зоной риска. После ополаскивания миокарда физиологическим раствором правый и левый желудочки разделяли и взвешивали, левый желудочек рассекали на срезы толщиной 2 мм параллельно оси сердца, которые окрашивали 1 %-ным раствором 2,3,5-трифенилтетразолия 30 мин при 37 °С. Срезы фиксировали в течение 1 сут в 10 %-ном растворе нейтрального формалина и сканировали (Scanjet G2710). Размер зоны некроза и зоны риска (гипоперфузии) определяли планиметрически с помощью программы Ellipse 2.02 (ViDiTo, Чешская республика) [15]. Величину инфаркта выражали в процентах от размера зоны риска. Образцы печени отсекали и замораживали в жидком азоте для определения уровня триглицеридов.

Уровни глюкозы, триацилглицеридов, холестерина в сыворотке крови оценивали ферментативным колориметрическим методом с помощью наборов В-8054, В-8322 и В-8069, «Вектор-бест» (Новосибирск, Россия). Инсулин и лептин определяли иммуноферментным методом с помощью наборов ab100578 (Abcam) и SEA084Ra (Cloud-Clone). Образцы измеряли, используя микропланшетный ридер Infinite 200 PRO (Tecan GmbH, Зальцбург, Австрия). Гомеостатическую модель оценки инсулинорезистентности (НОМА-IR) рассчитывали как соотношение инсулин-глюкоза/22,5.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 13.0 (StatSoft, Inc.). Полученные данные прошли проверку на согласие распределения с нормальным законом с помощью критериев Колмогорова–Смирнова (с поправкой Лиллиефорса) и критерия Шапиро–Уилка. Данные, соответствующие нормальному распределению, представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); при распределении, отличающемся от нормального, – в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (25 %; 75 %)). Проверку на гомогенность дисперсий проводили с использованием критерия Левене. При сравнении нескольких независимых выборок количественных данных использовали two-way ANOVA с последующим применением апостериорного критерия (поправки Бонферрони). Корреляционные взаимосвязи между параметрами исследовали с применением коэффициента Спирмена. Пороговое значение достигнутого уровня значимости p было принято равным 0,05.

Работа выполнена с помощью Центра коллективного пользования «Медицинская геномика».

Результаты исследования. Содержание крыс на ВУВЖД приводило к увеличению массы тела и массы абдоминального жира по сравнению с аналогичными показателями у животных соответствующего возраста в контрольной группе (табл. 1). В сыворотке крови наблюдали возрастание содержания глюкозы, общего холестерина, триглицеридов, инсулина, лептина (табл. 1). Расчет НОМА-IR показал значительное увеличение этого показателя в результате ВУВЖД, а глюкозотолерантный тест – увеличение показателя AUC (табл. 1). У крыс после ВУВЖД выявлено

Таблица 1. Показатели формирования метаболического синдрома при ВУВЖД ($M \pm SEM$)

Table 1. Indicators of the formation of the metabolic syndrome in the case of a high-fat and high-carbohydrate diet ($M \pm SEM$)

Параметр	Контроль ($n = 11$)	Индукцированный метаболический синдром ($n = 15$)	p
Масса, г	430,3 \pm 5,3	481,2 \pm 12,4	0,017
Масса абдоминального жира, г	8,32 \pm 1,12	16,46 \pm 1,55	0,0016
Инсулин, пМоль/л	14,1 \pm 1,03	17,48 \pm 1,51	0,113249
Глюкоза, мМоль/л	5,32 \pm 0,14	6,61 \pm 0,21	0,000204
НОМА-IR	3,33 \pm 0,25	5,21 \pm 0,56	0,0021
ГТТ (AUC)	452 \pm 10	570 \pm 8	0,003
Кортикостерон, нМоль/л	393,83 \pm 6,14	513,2 \pm 18,66	0,000021
Холестерин, мМоль/л	2,84 \pm 0,12	5,45 \pm 0,17	0,000020
Триглицериды, мМоль/л	1,23 \pm 0,16	2,09 \pm 0,13	0,001054
Лептин, нг/мл	1,85 \pm 0,2	4,41 \pm 0,4	0,000122

Примечание. Здесь и в табл. 2: p – значимость различий между группами (U -критерий Манна–Уитни). НОМА-IR – Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance, гомеостатическая модель оценки инсулинорезистентности; ГТТ (AUC) – глюкозотолерантный тест (площадь под кривой); ВУВЖД – высокоуглеводная высокожировая диета.

Таблица 2. Влияние индуцированного метаболического синдрома на артериальное давление у крыс, Ме (25 %; 75 %)

Table 2. Effect of the induced metabolic syndrome on the blood pressure in rats, Me (25 %; 75 %)

Параметр	Контроль (n = 11)	Индукцированный метаболический синдром (n = 15)	p
Систолическое давление	120 (112; 125)	137,5 (132,2; 141,4)	0,000000
Диастолическое давление	78 (72; 80)	92 (88,3; 94,8)	0,000000

повышение артериального давления (табл. 2). Полученные результаты позволяют рассматривать ВУВЖД как адекватную модель МетС. При этом возрастание кортикостерона можно рассматривать как показатель умеренного стресса (см. табл. 1).

Моделирование коронароокклюзии и реперфузии в контрольной группе крыс приводило к формированию инфаркта миокарда, размер которого составлял 43 % от размера зоны риска (рис. 1). Проведение перед началом реперфузии процедуры ДПост привело к сокращению размера инфаркта при тех же параметрах коронароокклюзии-реперфузии в 2 раза. Экспериментальный МетС не повлиял на размер инфаркта у крыс, не подвергнутых посткондиционированию. При моделировании ДПост у крыс с иМетС размер инфаркта оказался на 20 % ниже ($p = 0,0003$), чем у контрольных крыс, и на 25 % ниже ($p = 0,00003$), чем у животных с иМетС без ДПост. При этом размер инфаркта при моделировании ДПост в группе крыс с иМетС превышал этот показатель у крыс группы ДПост без иМетС (рис. 1).

Непараметрический корреляционный анализ выявил прямую зависимость размера инфаркта при ДПост от содержания лептина в сыворотке крови крыс с иМетС (рис. 2). Следует отметить, что связь размера инфаркта с уровнем лептина наблюдали только в этой экспериментальной группе.

Корреляционных связей между размером инфаркта и параметрами нарушения углеводного и липидного обмена не выявлено.

Обсуждение. В нашем исследовании для моделирования состояния, близкого к МетС, животных содержали на ВУВЖД, что приводило к ожирению, повышению артериального давления, нарушению липидного и углеводного обмена, гиперлептинемии. Согласно общепринятым кри-

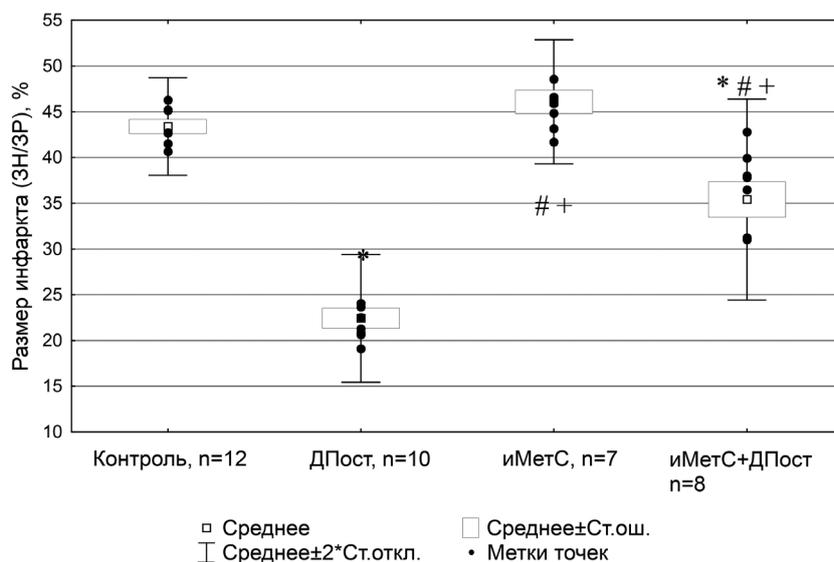


Рис. 1. Влияние индуцированного метаболического синдрома (иМетС) на инфаркт-лимитирующий эффект дистантного ишемического посткондиционирования (ДПост) миокарда у крыс. Значимость различий:

* – относительно контрольной группы, # – относительно ДПост, «+» – относительно иМетС, $p < 0,001$ (two way ANOVA с последующим апостериорным тестом Бонферрони)

Fig. 1. Influence of the induced metabolic syndrome on the infarct-limiting effect of remote ischemic postconditioning of the myocardium in rats. Significance of differences: * – relative to the control group, # – relative to distant postconditioning, “+” – relative to the induced metabolic syndrome, $p < 0.001$ (two way ANOVA followed by a posterior Bonferroni test)

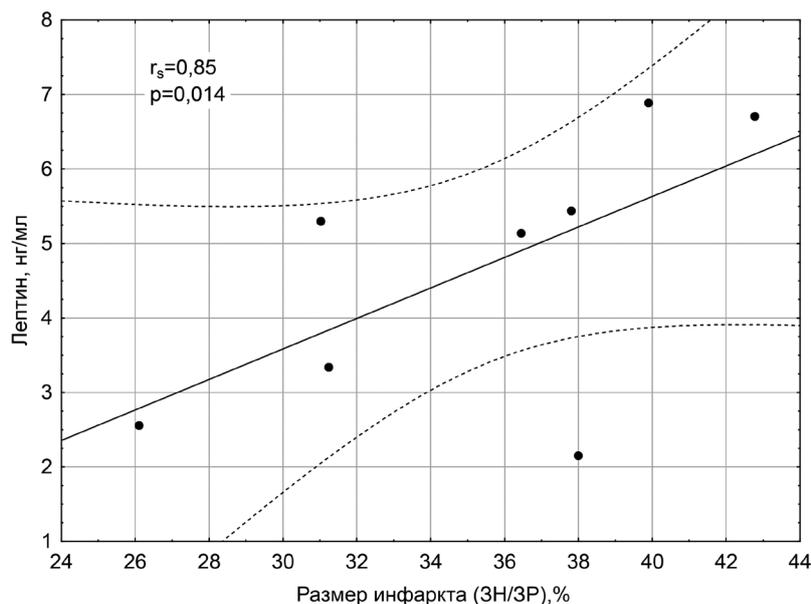


Рис. 2. Выраженность инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного посткондиционирования в зависимости от содержания лептина в сыворотке крови крыс с индуцированным метаболическим синдромом. r_s – коэффициент корреляции Спирмена

Fig. 2. Dependence of the severity of the infarct-limiting effect of remote postconditioning on the leptin content in the blood serum of rats with induced metabolic syndrome. r_s – Spearman correlation coefficient

териям, состояние соответствовало MetC [16]. При этом отмечалось вызванное диетой возрастание кортикостерона, что можно рассматривать в качестве умеренного стресса.

В настоящее время данные относительно влияния метаболических нарушений на чувствительность миокарда к ишемии/реперфузии противоречивы: часть исследователей отмечают увеличение размера инфаркта при гипергликемии и диабете [17], однако в литературе имеются сведения как о снижении размера инфаркта [18], так и об отсутствии таких изменений [3]. Результаты наших исследований показали, что содержание крыс на ВУВЖД не влияет на размер инфаркта.

При этом размер инфаркта не зависел от выраженности гипергликемии, нарушения толерантности к глюкозе, степени инсулинорезистентности или гиперлипидемии.

Согласно полученным нами результатам, инфаркт-лимитирующая эффективность ДПост у крыс при индуцированном MetC в 2 раза ниже, чем у контрольных животных. Полученные данные согласуются с известными фактами об отсутствии или снижении выраженности кондиционирующих воздействий у крыс после высококалорийной диеты [18, 19]. Кроме того, развитие кардиопротекторного эффекта ИПре предупреждают генетическая предрасположенность к ожирению у крыс линии Zucker obese rats [20] или db/db [21] или диабет второго типа (Goto-Kakizaki), ожирения при котором не наблюдается [20]. Известно, что отсроченное прекодиционирование не эффективно у мышей в случае диабета второго типа и генетически обусловленного MetC (у DKO или ob/ob mice) [22].

В качестве механизмов, определяющих несостоятельность защитных эффектов кондиционирующих воздействий, рассматриваются нарушение функционирования внутриклеточных киназных систем защиты [3, 18], ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [22] и инсулинорезистентность миокарда, обусловленная в том числе эндокринным влиянием жировой ткани [23].

Известно, что лептин и лептинорезистентность сопряжены с развитием ожирения и обуславливают его связь с развитием сердечно-сосудистой патологии [24]. Наше исследование показало более чем двукратное возрастание уровня лептина у крыс с иMetC. Гиперлептинемия наблюдается не только у животных с генетически обусловленным ожирением [21], но и у крыс с ожирением, развивающимся вследствие высококалорийной диеты [25]. Так, J. S. Russell с соавт. (2019) обнаружили, что ВУВЖД вызывает у мышей изменения, сходные с наблюдаемыми в нашем исследовании (гипергликемия, дислипидемия, повышение лептина, снижение толерантности к глюкозе).

При этом эффективность ИПре миокарда была снижена. Однако авторы не проводили анализ взаимосвязи уровня лептина и эффективности ИПре.

В нашей работе выявлена прямая корреляционная связь уровня лептина и размера инфаркта у крыс с иМетС при моделировании ДПост. Таким образом, можно предположить, что высокий уровень лептина при метаболических нарушениях препятствует формированию защитного действия ДПост.

В качестве механизма связи лептина с выраженностью кардиопротекции при ДПост можно предположить его влияние на активность внутриклеточных киназ, реализующих эффекты ДПост. Так, выявлено, что наличие лептина приводит к активации (фосфорилированию) p38 MAPK [26] – одного из ферментов, через ингибирование которого реализуется эффект фармакологического и ишемического посткондиционирования [27].

С другой стороны, низкую эффективность ДПост при иМетС можно объяснить лептинорезистентностью – состоянием, характерным для МС и обусловленным функциональной несостоятельностью лептинового рецептора [28]. Так, выявлено, что индуцированный высокожировой диетой иМетС приводит к снижению экспрессии белка лептинового рецептора и к уменьшению сократительного ответа кардиомиоцита на лептин [29]. При этом следует отметить, что введение лептина животным без метаболических нарушений перед моделированием коронароокклюзии приводит к снижению размера инфаркта [30]. Можно предположить, что внутриклеточные механизмы, активируемые лептином, опосредуют кардиопротекцию при кондиционировании, а в условиях лептинорезистентности этот механизм не эффективен. Однако эта гипотеза нуждается в подтверждении.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить, что снижение эффективности ДПост у крыс с индуцированным диетой МетС зависит от содержания лептина. Однако для подтверждения взаимосвязи уровня лептина, резистентности к нему и снижением эффективности ДПост требуется проведение дополнительных исследований. Применение ДПост у пациентов с острым нарушением коронарного кровообращения должно быть скорректировано при наличии гиперлептинемии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 22-45-02005). Исследования с лептином проводились в рамках государственного задания АААА-А15-115120910024-0.

Acknowledgements. This study was supported by the Russian Science Foundation (grant 22-45-02005). The leptin studies were carried out within the framework of the state assignments АААА-А15-115120910024-0.

Список использованных источников

1. Braunwald, E. The war against heart failure: the Lancet lecture / E. Braunwald // *Lancet*. – 2015. – Vol. 385, N 9970. – P. 812–824. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61889-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61889-4)
2. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury / S. B. Ong [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2015. – Vol. 78. – P. 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.11.005>
3. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols / C. Penna [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 177, N 23. – P. 5312–5335. <https://doi.org/10.1111/bph.14993>
4. 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>
5. Vinten-Johansen, J. The science and clinical translation of remote postconditioning / J. Vinten-Johansen, W. J. Shi // *J. Cardiovasc. Med.* – 2013. – Vol. 14, N 3. – P. 206–213. <https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e32835cecc6>
6. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning / Z. Q. Zhao [et al.] // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285, N 2. – P. H579–H588. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002>
7. Molecular mechanisms of obesity-linked cardiac dysfunction: an up-date on current knowledge / J. Gutiérrez-Cuevas [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, N 3. – P. 629. <https://doi.org/10.3390/cells10030629>
8. Postconditioning fails to reduce the infarct sizes in hearts from rats with metabolic syndrome: role of glycogen synthase kinase 3beta / C. Reußner [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2006. – Vol. 40, N 6. – Art. 970. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.03.150>
9. Autophagy is involved in the cardioprotection effect of remote limb ischemic postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in normal mice, but not diabetic mice / Z. Han [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, N 1. – P. e86838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086838>
10. Hyperlipidaemia and cardioprotection: Animal models for translational studies / I. Andreadou [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 177, N 23. – P. 5287–5311. <https://doi.org/10.1111/bph.14931>

11. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning / T. Baranyai [et al.] // *Cardiovasc. Diabet.* – 2015. – Vol. 14. – Art. 151. <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0313-1>
12. Long-term effect of remote ischemic conditioning on infarct size and clinical outcomes in patients with anterior ST-elevation myocardial infarction / D. Verouhis [et al.] // *Catheter. Cardiovasc. Interv.* – 2021. – Vol. 97, N 3. – P. 386–392. <https://doi.org/10.1002/ccd.28760>
13. Diabetes mellitus and the metabolic syndrome do not abolish, but might reduce, the cardioprotective effect of ischemic postconditioning / W. Oosterlinck [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2013. – Vol. 145, N 6. – P. 1595–1602. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2013.02.016>
14. High carbohydrate high fat diet induces the production of connective tissue growth factors, increased blood pressure, and changes in the aortic wall in aged rats / N. Naryzhnaya [et al.] // *FASEB J.* – 2021. – Vol. 35, N S1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2021.35.S1.05125>
15. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia / J. Neckář [et al.] // *Physiol. Res.* – 2003. – Vol. 52, N 2. – P. 171–175.
16. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 / M. N. Forouzanfar [et al.] // *Lancet.* – 2016. – Vol. 388, N 10053. – P. 1659–724. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8)
17. Acute hyperglycaemia enhances oxidative stress and aggravates myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of thioredoxin-interacting protein / H. Su [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2013. – Vol. 17, N 1. – P. 181–191. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01661.x>
18. Long-chain free fatty acids inhibit ischaemic preconditioning of the isolated rat heart / A. Lochner [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2020. – Vol. 473, N 1–2. – P. 111–132. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03812-9>
19. Myocardial susceptibility to ischaemia/reperfusion in obesity: a re-evaluation of the effects of age / I. Webster [et al.] // *BMC Physiol.* – 2017. – Vol. 17, N 1. – Art. 3. <https://doi.org/10.1186/s12899-017-0030-y>
20. Ischaemic preconditioning does not protect the heart in obese and lean animal models of type 2 diabetes / S. B. Kristiansen [et al.] // *Diabetologia.* – 2004. – Vol. 47, N 10. – P. 1716–1721. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1514-4>
21. Zhu, S. G. Type 2 diabetic obese db/db mice are refractory to myocardial ischaemic post-conditioning *in vivo*: potential role for Hsp20, F1-ATPase δ and Echs1 / S. G. Zhu, L. Xi, R. C. Kukreja // *J. Cell. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 16, N 4. – P. 950–958. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01376.x>
22. Angiotensin-converting enzyme inhibition and food restriction restore delayed preconditioning in diabetic mice / G. van der Mieren [et al.] // *Cardiovasc. Diabetol.* – 2013. – Vol. 12, N 1. – P. 36. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-36>
23. Hypertrophic adipocyte-derived exosomal mir-802-5p contributes to insulin resistance in cardiac myocytes through targeting HSP60 / Z. Wen [et al.] // *Obesity.* – 2020. – Vol. 28, N 10. – P. 1932–1940. <https://doi.org/10.1002/oby.22932>
24. Adipokines: new potential therapeutic target for obesity and metabolic, rheumatic, and cardiovascular diseases / L. Recinella [et al.] // *Front Physiol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 578966. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.578966/full>
25. Chronic type 2 but not type 1 diabetes impairs myocardial ischaemic tolerance and preconditioning in C57Bl/6 mice / J. S. Russell [et al.] // *Exp. Physiol.* – 2019. – Vol. 104, N 12. – P. 1868–1880. <https://doi.org/10.1113/EP088024>
26. Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes / K. Schram [et al.] // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2010. – Vol. 15, N 4. – P. 551–563. <https://doi.org/10.2478/s11658-010-0027-z/html>
27. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways / H. Y. Sun [et al.] // *Apoptosis.* – 2006. – Vol. 11, N 9. – P. 1583–1593. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-9037-8>
28. Leptin and obesity: role and clinical implication / M. Obradovic [et al.] // *Front Endocrinol. (Lausanne).* – 2021. – Vol. 12. – Art. 585887. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>
29. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response / J. Ren [et al.] // *Obesity.* – 2008. – Vol. 16, N 11. – P. 2417–2423. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.38>
30. Xu, T. Amelioration of myocardial ischemia/reperfusion injury by leptin pretreatment and ischemic preconditioning in mouse / T.-T. Xu, S.-P. Liu, X.-S. Wang // *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* – 2010. – Vol. 22, N 2. – P. 105–108.

References

1. Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet*, 2015, vol. 385, no. 9970, pp. 812–824. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61889-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61889-4)
2. Ong S. B., Samangouei P., Kalkhoran S. B., Hausenloy D. J. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2015, vol. 78, pp. 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2014.11.005>
3. Penna C., Andreadou I., Aragno M., Beauloye C., Bertrand L., Lazou A. [et al.]. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *British Journal of Pharmacology*, 2020, vol. 177, no. 23, pp. 5312–5335. <https://doi.org/10.1111/bph.14993>
4. 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>
5. Vinten-Johansen J., Shi W. The science and clinical translation of remote postconditioning. *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown)*, 2013, vol. 14, no. 3, pp. 206–213. <https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e32835cecc6>

6. Zhao Z. Q., Corvera J. S., Halkos 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>
7. Gutiérrez-Cuevas J., Sandoval-Rodríguez A., Meza-Ríos A., Monroy-Ramírez H. C., Galicia-Moreno M., García-Bañuelos J., Santos A., Armendariz-Borunda J. Molecular mechanisms of obesity-linked cardiac dysfunction: an up-date on current knowledge. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 3, p. 629. <https://doi.org/10.3390/cells10030629>
8. Reußner C., Klötting I., Strasser R. H., Weinbrenner C. Postconditioning fails to reduce the infarct sizes in hearts from rats with metabolic syndrome: role of glycogen synthase kinase 3beta. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2006, vol. 40, no. 6, art. 970. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.03.150>
9. Han Z., Cao J., Song D., Tian L., Chen K., Wang Y., Gao L., Yin Z., Fan Y., Wang C. Autophagy is involved in the cardioprotection effect of remote limb ischemic postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in normal mice, but not diabetic mice. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 1, p. e86838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086838>
10. Andreadou I., Schulz R., Badimon L., Adameová A., Kleinbongard P., Lecour S. [et al.]. Hyperlipidaemia and cardioprotection: animal models for translational studies. *British Journal of Pharmacology*, 2020, vol. 177, no. 23, pp. 5287–5311. <https://doi.org/10.1111/bph.14931>
11. Baranyai T., Nagy C. T., Koncsos G., Onódi Z., Károlyi-Szabó M., Makkos A., Varga Z. V., Ferdinandy P., Giricz Z. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Cardiovascular Diabetology*, 2015, vol. 14, art. 151. <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0313-1>
12. Verouhis D., Sörensson P., Gourine A., Henareh L., Persson J., Saleh N. [et al.]. Long-term effect of remote ischemic conditioning on infarct size and clinical outcomes in patients with anterior ST-elevation myocardial infarction. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 2021, vol. 97, no. 3, pp. 386–392. <https://doi.org/10.1002/ccd.28760>
13. Oosterlinck W., Dresselaers T., Geldhof V., Nevelsteen I., Janssens S., Himmelreich U., Herijgers P. Diabetes mellitus and the metabolic syndrome do not abolish, but might reduce, the cardioprotective effect of ischemic postconditioning. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2013, vol. 145, no. 6, pp. 1595–1602. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2013.02.016>
14. Naryzhnaya N., Kurbatov B., Gorbunov A., Derkachev I., Logvinov S., Birulina J., Maslov L. High carbohydrate high fat diet induces the production of connective tissue growth factors, increased blood pressure, and changes in the aortic wall in aged rats. *FASEB Journal*, 2021, vol. 35, no. S1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2021.35.S1.05125>
15. Neckár J., Szárszoi O., Herget J., Ostádal B., Kolár F. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiological Research*, 2003, vol. 52, no. 2, pp. 171–175.
16. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 2016, vol. 388, no. 10053, pp. 1659–724. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8)
17. Su H., Ji L., Xing W., Zhang W., Zhou H., Qian X., Wang X., Gao F., Sun X., Zhang H. Acute hyperglycaemia enhances oxidative stress and aggravates myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of thioredoxin-interacting protein. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2013, vol. 17, no. 1, pp. 181–191. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01661.x>
18. Lochner A., Genade S., Genis A., Marais E., Salie R. Long-chain free fatty acids inhibit ischaemic preconditioning of the isolated rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2020, vol. 473, no. 1–2, pp. 111–132. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03812-9>
19. Webster I., Salie R., Marais E., Fan W. J., Maarman G., Huisamen B., Lochner A. Myocardial susceptibility to ischaemia/reperfusion in obesity: a re-evaluation of the effects of age. *BMC Physiology*, 2017, vol. 17, no. 1, art. 3. <https://doi.org/10.1186/s12899-017-0030-y>
20. Kristiansen S. B., Løfgren B., Støttrup N. B., Khatir D., Nielsen-Kudsk J. E., Nielsen T. T., Bøtker H. E., Flyvbjerg A. Ischaemic preconditioning does not protect the heart in obese and lean animal models of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2004, vol. 47, no. 10, pp. 1716–1721. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1514-4>
21. Zhu S. G., Xi L., Kukreja R. C. Type 2 diabetic obese db/db mice are refractory to myocardial ischaemic post-conditioning *in vivo*: potential role for Hsp20, F1-ATPase δ and Echs1. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2012, vol. 16, no. 4, pp. 950–958. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01376.x>
22. van der Mieren G., Nevelsteen I., Vanderper A., Oosterlinck W., Flameng W., Herijgers P. Angiotensin-converting enzyme inhibition and food restriction restore delayed preconditioning in diabetic mice. *Cardiovascular Diabetology*, 2013, vol. 12, no. 1, p. 36. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-36>
23. Wen Z., Li J., Fu Y., Zheng Y., Ma M., Wang C. Hypertrophic adipocyte-derived exosomal miR-802-5p contributes to insulin resistance in cardiac myocytes through targeting HSP60. *Obesity*, 2020, vol. 28, no. 10, pp. 1932–1940. <https://doi.org/10.1002/oby.22932>
24. Recinella L., Orlando G., Ferrante C., Chiavaroli A., Brunetti L., Leone S. Adipokines: new potential therapeutic target for obesity and metabolic, rheumatic, and cardiovascular diseases. *Frontiers in Physiology*, 2020, vol. 11, p. 578966. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.578966/full>
25. Russell J. S., Griffith T. A., Helman T., Du Toit E. F., Peart J. N., Headrick J. P. Chronic type 2 but not type 1 diabetes impairs myocardial ischaemic tolerance and preconditioning in C57Bl/6 mice. *Experimental Physiology*, 2019, vol. 104, no. 12, pp. 1868–1880. <https://doi.org/10.1113/EP088024>
26. Schram K., De Girolamo S., Madani S., Munoz D., Thong F., Sweeney G. Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2010, vol. 15, no. 4, pp. 551–563. <https://doi.org/10.2478/s11658-010-0027-z/html>

27. Sun H. Y., Wang N. P., Halkos M., Kerendi F., Kin H., Guyton R. A., Vinten-Johansen J., Zhao Z. Q. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis*, 2006, vol. 11, no. 9, pp. 1583–1593. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-9037-8>

28. Obradovic M., Sudar-Milovanovic E., Soskic S., Essack M., Arya S., Stewart A. J., Gojobori T., Isenovic E. R. Leptin and obesity: role and clinical implication. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2021, vol. 12, art. 585887. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>

29. Ren J., Zhu B. H., Relling D. P., Esberg L. B., Ceylan-Isik A. F. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. *Obesity*, 2008, vol. 16, no. 11, pp. 2417–2423. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.38>

30. Xu T.-T., Liu S.-P., Wang X.-S. Wang Amelioration of myocardial ischemia/reperfusion injury by leptin pretreatment and ischemic preconditioning in mouse. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2010, vol. 22, no. 2, pp. 105–108.

Информация об авторах

Нарыжная Наталья Владимировна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (ул. Киевская, 111А, 634012, г. Томск, Российская Федерация). E-mail: natalynar@yandex.ru

Логвинов Сергей Валентинович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (ул. Киевская, 111А, 634012, г. Томск, Российская Федерация), Сибирский государственный медицинский университет (Московский тракт, 2, 634050, г. Томск, Российская Федерация). E-mail: s_logvinov@mail.ru

Курбатов Борис Константинович – мл. науч. сотр. Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (ул. Киевская, 111А, 634012, г. Томск, Российская Федерация). E-mail: bobersanker@gmail.com

Мухомедзянов Александр Валерьевич – канд. мед. наук, мл. науч. сотр. Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (ул. Киевская, 111А, 634012, г. Томск, Российская Федерация). E-mail: sasha_m91@mail.ru

Сиротина Мария Александровна – аспирант. Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (ул. Киевская, 111А, 634012, г. Томск, Российская Федерация). E-mail: sirotina_maria@mail.ru

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

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

Natalia V. Naryzhnaya – D. Sc. (Med.), Leading Researcher. Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (111A, Kievskaya Str., 634012, Tomsk, Russian Federation). E-mail: natalynar@yandex.ru

Sergey V. Logvinov – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (111A, Kievskaya Str., 634012, Tomsk, Russian Federation), Siberian State Medical University (2, Moskovski trakt, 634050, Tomsk, Russian Federation). E-mail: s_logvinov@mail.ru

Boris K. Kurbatov – Junior Researcher. Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (111A, Kievskaya Str., 634012, Tomsk, Russian Federation). E-mail: bobersanker@gmail.com

Alexandr V. Mukhomedyanov – Ph. D. (Med.), Junior Researcher. Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (111A, Kievskaya Str., 634012, Tomsk, Russian Federation). E-mail: sasha_m91@mail.ru

Maria A. Sirotina – Postgraduate student. Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (111A, Kievskaya Str., 634012, Tomsk, Russian Federation). E-mail: sirotina_maria@mail.ru

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

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 575.224:577.121:577.112.386.2/5:577.16

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-48-61>

Поступила в редакцию 10.02.2021

Received 10.02.2021

**А. А. Гусина¹, А. В. Зиновик¹, И. В. Наумчик¹, В. Д. Кулак¹, И. Н. Мотюк²,
А. С. Бойша³, С. О. Мясников¹, А. С. Стальбко¹, Н. Б. Гусина¹**

¹Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Республика Беларусь

²Гродненский областной клинический перинатальный центр, Гродно, Республика Беларусь

³Могилевский областной лечебно-диагностический центр, Могилев, Республика Беларусь

КЛИНИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛАССИЧЕСКОЙ ГОМОЦИСТИНУРИИ

Аннотация. Классическая гомоцистинурия – аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное дефицитом активности цистатионин-β-синтазы, возникающим вследствие мутаций в гене *CBS*.

Цель исследования – определить особенности клинических проявлений и установить мутации в гене *CBS* у пациентов с классической гомоцистинурией в Республике Беларусь.

В исследуемую группу были включены пациенты с классической гомоцистинурией и их здоровые сибсы (3 пробанда и 2 сибса) из трех неродственных семей. Диагноз классической гомоцистинурии пробандам был установлен на основании количественного определения концентрации общего гомоцистеина. Поиск мутаций в гене *CBS* осуществлен с помощью высокопроизводительного секвенирования. Наличие выявленных вариантов у пробандов и их сибсов было подтверждено секвенированием по Сэнгеру.

У всех обследованных пробандов выявлены характерные клинические признаки классической гомоцистинурии: врожденное смещение хрусталиков, изменения со стороны скелета. У 2 из 3 пробандов были отмечены симптомы поражения нервной системы, в том числе задержка развития и умственная отсталость, судороги, психические нарушения.

У пробанда 1 выявлена миссенс-мутация с.430G>C (p.Glu144Gln, rs121964966) в гомозиготном состоянии. Пробанд 2 являлся гомозиготным носителем замены с.473C>T p.(Ala158Val, rs1376851289). У пробанда 3 обнаружен миссенс-вариант с.1064C>T p.(Ala355Val, rs772384826). Сибсы пробандов 1 и 3 являлись носителями соответствующих мутаций в гетерозиготном состоянии.

Классическая гомоцистинурия – весьма редкое заболевание в Республике Беларусь. Все случаи заболеваемости в Беларуси обусловлены очень редкими мутациями, не зарегистрированными в граничащих с республикой странах, и являются следствием браков между родственниками или уроженцами одной местности. Нами впервые описаны фенотипические проявления мутаций p.Glu144Gln и p.Ala355Val, расширено описание спектра клинических проявлений замены Ala158Val, проведена оценка клинической значимости выявленных вариантов в соответствии с современными критериями.

Ключевые слова: гомоцистинурия, мутации в гене *CBS*, дефицит цистатионин-β-синтазы, гомоцистеин, метионин, клинические проявления, подвывих хрусталика

Для цитирования: Клинические и молекулярно-генетические характеристики классической гомоцистинурии / А. А. Гусина [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 48–61. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-48-61>

**Asya A. Gusina¹, Aliaksandr V. Zinovik¹, Irina V. Naumchik¹, Victoria D. Kulak¹, Irina N. Motiuk²,
Anna S. Boisha³, Sviatoslav O. Miasnikov¹, Nastya S. Stalybko¹, Nina B. Gusina¹**

¹Republican Scientific Practical Centre «Mother and child», Minsk, Republic of Belarus

²Grodno Regional Clinical Perinatal Center, Grodno, Republic of Belarus

³Mogilev Regional Treatment and Diagnostic Center, Mogilev, Republic of Belarus

CLINICAL AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF CLASSICAL HOMOCYSTINURIA

Abstract. Classical homocystinuria is caused by a genetic mutation in the *CBS* gene, which leads to low levels or absence of an enzyme called cystathionine beta-synthase.

The purpose of the study was to analyze the clinical features and molecular and genetic data of patients with classical homocystinuria in Belarus.

The study group included patients with classical homocystinuria and their healthy siblings (3 probands and 2 siblings) from three unrelated families. Diagnosis of homocystinuria was made on a quantitative determination of the total homocysteine level in plasma. The next-generation sequencing was performed for the molecular genetic analysis of the *CBS* gene. The presence of the identified variants in probands and their siblings was confirmed by the Sanger sequencing.

All probands had specific clinical signs of classic homocystinuria: ectopia lentis, skeletal pathology, intellectual, psychiatric, behavioural problems and seizures (in 2 of 3 probands).

Homozygous missense-mutations c.430G>C (p.Glu144Gln, rs121964966), c.473C>T p.(Ala158Val, rs1376851289) and 1064C>T p.(Ala355Val, rs772384826) were identified in proband 1, 2 and 3 respectively. Healthy siblings of probands 1 and 3 were the heterozygous carriers of the corresponding mutations.

Classical homocystinuria is a very rare disease in the Republic of Belarus. All cases of the disease in Belarus are caused by very rare mutations not registered in the neighboring countries and are the result of marriages between the relatives or the natives of the same area. We have described for the first time the phenotypic manifestations of the p.Glu144Gln and p.Ala355Val mutations, expanded the description of the spectrum of clinical manifestations of the Ala158Val substitution, and assessed the clinical significance of the identified variants in accordance with the modern criteria.

Keywords: homocystinuria, mutations in the *CBS* gene, cystathionine beta-synthase deficiency, homocysteine, methionine, clinical manifestations, lens subluxation

For citation: Gusina A. A., Zinovic A. V., Naumchik I. V., Kulak V. D., Motiuk I. N., Boisha A. S., Miasnikov S. O., Stalybko N. S., Gusina N. B. Clinical and molecular genetic characteristics of classical homocystinuria. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 48–61 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-48-61>

Введение. Гомоцистинурия – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное дефицитом активности ферментов метаболизма серосодержащей аминокислоты метионина. Известно 13 форм гомоцистинурии [1]. Наиболее распространены пиридоксин (витамин В6) зависимая (чувствительная) и пиридоксин-резистентная формы заболевания, известные как классическая гомоцистинурия [2]. Причиной классической гомоцистинурии является недостаточность цистатионин-β-синтазы [3]. Этот пиридоксин-зависимый фермент осуществляет транссульфатирование гомоцистеина и превращает его в цистатионин. Нарушение транссульфатирования приводит к увеличению концентрации общего гомоцистеина и метионина в крови. Более редкие формы гомоцистинурии связаны с дефектами реметилирования гомоцистеина. При нарушениях реметилирования содержание метионина в крови остается нормальным или снижается, а при патологии метаболизма кобаламина в крови повышается также количество метилмалоновой кислоты [1].

Синтез цистатионин-β-синтазы кодирует ген *CBS*, расположенный в области длинного плеча хромосомы 21, в локусе q22.3 [4]. В открытых базах данных (ClinVar, dbSNP) в гене *CBS* зарегистрировано более 200 патогенных и вероятно патогенных мутаций, а также вариантов с неопределенной клинической значимостью. Более половины из них – миссенс-мутации, большая часть из которых уникальны. Доля нонсенс-мутаций не превышает 10 % от всех мутантных аллелей. Остальные варианты представлены мелкими делециями, инсерциями и мутациями сплайсинга. Протяженные делеции гена *CBS* описаны в единичных случаях [2].

Наиболее распространенными мутациями в гене *CBS* являются p.Arg336Cys, p.Ile278Thr, p.Gly307Ser, p.Thr191Met и p.Trp323Ter. В сумме на их долю приходится 47 % мутантных аллелей – 14, 13, 10, 8 и 2 % соответственно [5].

Замена p.Arg336Cys (NM_000071.2(CBS):c.1006C>T, rs398123151) является самым частым вариантом в Катаре (97 % от всех аллелей) [5]. У пациентов европейского происхождения эту мутацию обнаруживают не более чем в 10 % случаев [5]. В гомозиготном состоянии p.Arg336Cys приводит к развитию тяжелой пиридоксин-резистентной формы классической гомоцистинурии [6].

Мутация p.Ile278Thr (NM_000071.3(CBS):c.833T>C, rs5742905) – панэтническая. Этот вариант является самым распространенным в Бразилии, Франции, Израиле, США, Чехии, Словакии, Дании, Италии, Англии, Германии, Польше и Нидерландах. В этих странах на его долю приходится от 16 до 55 % от всех мутантных аллелей [5]. Гомозиготное носительство p.Ile278Thr приводит к развитию пиридоксин-чувствительной формы заболевания. У компаундных гетерозиготных носителей отмечена по меньшей мере частичная чувствительность к пиридоксину [7]. Примерно 5–10 % жителей США и Европы являются носителями полиморфизма 844ins68 – вставочной мутации в 8-м экзоне гена цистатионин-β-синтазы [8]. Эта вставка формирует альтернативный сайт сплайсинга на границе 7-го интрона и 8-го экзона гена *CBS* [9]. Мутация 844ins68, выявленная только в сочетании с p.Ile278Thr мутацией, устраняет негативное влияние последней [10].

Мутация p.Gly307Ser (NM_000071.2(CBS):c.919G>A, rs121964962) описана у пациентов из США, Европы, Израиля, Катара. Этот вариант является самой частой причиной классической гомоцисти-

нурии в Ирландии (66 % от всех патогенных аллелей) и в Австралии (22 %) [5]. Гомозиготное носительство р.Gly307Ser ассоциируется с тяжелой пиридоксин-резистентной формой заболевания [7].

В странах Иберийского полуострова и их бывших колоний в Латинской Америке наиболее распространенным патогенным вариантом является р.Thr191Met (NM_000071.2(CBS):c.572C>T, rs121964973): 23 и 44 % от всех мутантных аллелей в Португалии и Испании, 20 и 73 % – в Венесуэле и Колумбии [5].

Мутация р.Trp323Ter (NM_000071.2(CBS):c.969G>A, rs863223432) – самая частая причина классической гомоцистинурии в Саудовской Аравии (77 % от всех мутантных аллелей) [5]. Гомозиготные носители вариантов р.Thr191Met и р.Trp323Ter, как правило, имеют тяжелые или умеренно тяжелые проявления заболевания и нечувствительны к терапии пиридоксином [11].

Частота гетерозиготного носительства замен р.Arg336Cys, р.Ile278Thr и р.Gly307Ser в европейских странах составляет 0,004; 0,143 и 0,03 % соответственно [5].

В России наиболее частой мутацией в гене *CBS* является вариант сплайсинга с.1224-2A>C (IVS11-2A->C, rs375846341) – 27,0 % от всех мутантных аллелей [12]. В этой стране также зарегистрированы мутации р.Lys384Asn, с.1560-1569delCACCGGAAG, р.Ile278Thr, р.Cys109Arg, с.216-217delAT, Gln368Term, Thr353Met, Trp390Term, Glu302Lys, с.1498_1499delT, Asp444Tyrp [2, 12]. Распространенный в Чехии и Словакии вариант с.1224-2A>C ассоциируется с развитием пиридоксин-резистентного фенотипа [5, 12, 13].

Частота классической гомоцистинурии в мире колеблется от 416 случаев на 100 000 на острове Ланьюй и 55 на 100 000 в Катаре до менее чем 1 случай на миллион на Тайване [5]. В европейских странах частота классической гомоцистинурии (на 100 000) в среднем составляет 0,72 случая [5], при этом в некоторых странах распространенность этого заболевания значительно превышает среднюю: 15,6 случая в Норвегии, 5,6 – в Германии, 2,5 случая в Чехии [5].

Клинические проявления классической гомоцистинурии включают врожденное смещение хрусталика и/или миопию тяжелой степени, тромбозы артериальных и венозных сосудов, задержку развития/умственную отсталость, судороги, психические нарушения, изменения со стороны скелета [1, 2, 7, 12, 13]. Могут наблюдаться гипопигментация кожи и волос, эритема в области носа и щек, напоминающая «волчаночную бабочку», livedo reticularis, панкреатит [7, 13].

В соответствии с международными рекомендациями по диагностике и лечению гомоцистинурии, обусловленной недостаточностью цистатионин-β-синтазы, первым и основным тестом для диагностики этого заболевания является определение концентрации общего гомоцистеина в плазме крови [14]. В норме содержание общего гомоцистеина в плазме крови составляет 5–10 мкмоль/л у детей и 5–15 мкмоль/л у взрослых [15]. У пациентов с классической гомоцистинурией уровень общего гомоцистеина обычно превышает 100 мкмоль/л [14]. Дополнительными диагностическими признаками являются повышение концентрации метионина и снижение содержания цистеина в плазме крови. Диагноз необходимо верифицировать с помощью определения активности цистатионин-β-синтазы или идентификации мутаций в гене *CBS* [13, 14].

Лечение классической гомоцистинурии направлено на снижение концентрации общего гомоцистеина до уровня, максимально близкого к нормальному. Поскольку достичь такого уменьшения концентрации удастся не всегда, рекомендуется поддерживать содержание общего гомоцистеина на уровне менее 50 мкмоль/л при пиридоксин-зависимой форме и менее 100 мкмоль/л при пиридоксин-резистентной [14]. Терапия классической гомоцистинурии включает диету, ограничивающую поступление метионина, и прием препаратов, снижающих концентрацию гомоцистеина за счет оптимизации его метаболизма: пиридоксина, бетаина, цианокобаламина, фолиевой кислоты [13, 14].

Цель исследования – определить особенности клинических проявлений и установить мутации в гене *CBS* у пациентов с классической гомоцистинурией в Республике Беларусь.

Материалы и методы исследования. В исследуемую группу были включены пациенты с классической гомоцистинурией и их здоровые сибсы (3 пробанда и 2 сибса) из трех неродственных семей. Концентрацию общего гомоцистеина, фолиевой кислоты и витамина B12 в крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью диагностикумов производства DRG International, Inc. (США) согласно инструкции производителя. Забор крови, отделение плазмы

и хранение биологического материала для исследования уровня общего гомоцистеина осуществляли в соответствии с рекомендациями Refsum с соавт. [15]. Концентрацию метионина в образцах крови, высушенных на бланках для неонатального скрининга, измеряли методом tandemной масс-спектрометрии (ТМС) на приборе Wallac MS2 1445 Tandem Mass Spectrometer, Wallac Oy (Финляндия) с использованием наборов реагентов NeoGram MSMS kit (PerkinElmer, Inc., США).

В качестве материала для молекулярно-генетического исследования была использована ДНК, выделенная из лейкоцитов крови. Пациентам было выполнено высокопроизводительное секвенирование на приборе NextSeq500 (Illumina Inc., San Diego, CA, США) с использованием панели TruSight Inherited Disease (Illumina Inc., San Diego, CA, США).

Обработка данных высокопроизводительного секвенирования была выполнена с помощью доступных интернет-ресурсов, картирование прочтений на референтный геном GRCh37 и генерация VCF-файла – с помощью Illumina DRAGEN Bio-IT Platform. Для дальнейшего аннотирования вариантов использовали программу Variant Interpreter. Патогенность выявленных мутаций оценивали на основании данных доступных источников литературы и ресурса VarSome (<https://varsome.com/>).

Наличие выявленных вариантов у пробандов и их сибсов было подтверждено секвенированием по Сэнгеру, которое проводилось на автоматическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, США) с использованием Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing kit по протоколу производителя. Анализ данных секвенирования выполняли с помощью программного обеспечения SeqScape Software3 v3.0 и Sequencing Analysis Software6 v6.0. Амплификацию экзонов *CBS* осуществляли на амплификаторе Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) с помощью олигонуклеотидных праймеров, описанных Gong с соавт. [16].

Информированное согласие на проведение молекулярно-генетического тестирования было получено от родителей пациентов и их сибсов. Форма информированного согласия была разработана в соответствии с требованиями Закона Республики Беларусь «О здравоохранении».

Результаты и их обсуждение. За период с 2004 по 2020 г. в Республике Беларусь было диагностировано три случая классической гомоцистинурии.

Семья 1. Пробанд – мальчик, родился в срок от второй беременности с нормальными показателями массы и длины тела. В возрасте до 1 года отмечена дисплазия тазобедренных суставов. До 3 лет рос и развивался без особенностей. В 3 года отмечено ухудшение зрения и диагностирован подвывих хрусталиков обоих глаз. Брак родителей не родственник, однако оба родителя родом из одного района Беларуси. От первой беременности имеют дочь, девочка здорова. При осмотре генетиком в 4 года отмечены жалобы на боли в ногах, показатели физического развития в пределах 10–50-го перцентиля возрастной нормы (рост 100 см, масса 14 кг, окружность головы 51 см), задержка речевого развития, пропорциональное телосложение, околоушная фистула справа, эпикант, высокое небо, арахнодактилия, легкая гипермобильность суставов, плосковальгусная деформация стоп. При аускультации выявлен систолический шум в области сердца. При эхокардиографии обнаружен пролапс митрального клапана I степени. Нефрологом зафиксирована двусторонняя пиелэктазия. Гастроэнтеролог диагностировал долихосигму, спастический колит. При проведении селективного скрининга отмечена положительная проба на гомоцистин в моче. При тонкослойной хроматографии аминокислот мочи выявлены гомоцистин и метионин. Концентрация общего гомоцистеина в плазме крови составила 240 мкмоль/л. Начато лечение витамином В6 (300 мг/сут) и фолиевой кислотой (5 мг/сут). В течение 4,5 мес. уровень общего гомоцистеина в плазме крови снизился до 37 мкмоль/л, однако затем снова стал повышаться и через 7 мес. от начала лечения был равен 215 мкмоль/л. К лечению был добавлен бетаин в дозе 5 г/сут, но добиться снижения концентрации общего гомоцистеина менее 100 мкмоль/л не удалось. Динамика концентрации общего гомоцистеина у пациента показана на рис. 1.

На фоне лечения наблюдалась выраженная положительная динамика психо-речевого развития, пациент стал более подвижным, прекратились боли в ногах. В возрасте 5 лет отмечена заметная динамика показателя роста (+11 см за 1 год), который достиг 75-ного перцентиля, показатели массы тела и окружности головы сохранялись на уровне 50-го перцентиля. При осмотре в дополнение к ранее описанным изменениям обнаружены умеренная долихостеномелия, крыловидные лопатки, увеличение лучезапястных, голеностопных, коленных суставов, выраженная

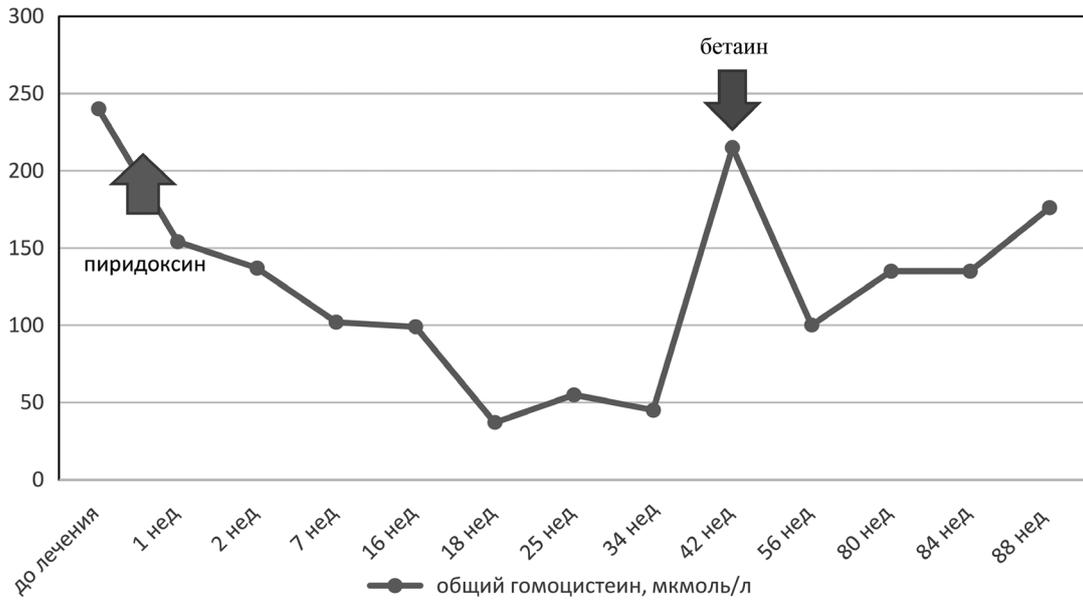


Рис. 1. Динамика концентрации общего гомоцистеина у пациента 1 на фоне терапии пиридоксином и бетаином

Fig 1. Total homocysteine concentration in patient 1 during pyridoxine and betaine therapy

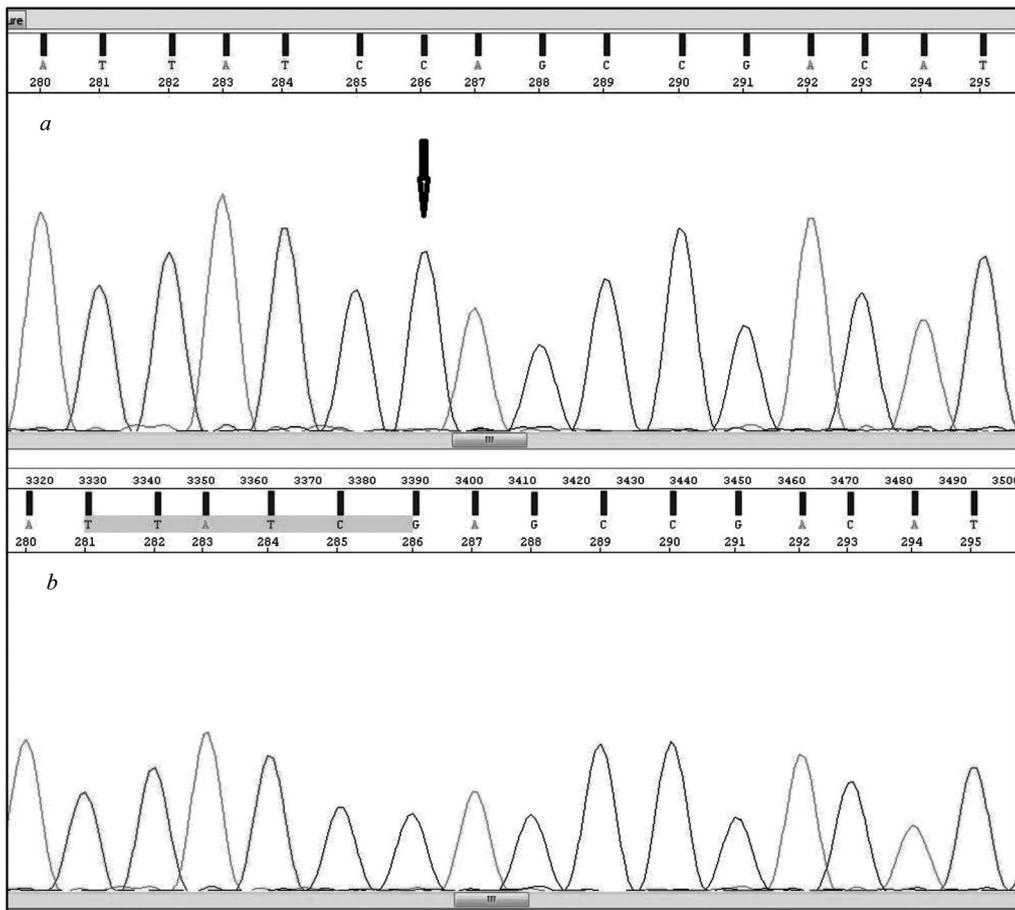


Рис. 2. Мутация p.Glu144Gln в гене CBS в гомозиготном состоянии у пробанда 1 (a), нормальная последовательность в контрольном образце (b)

Fig 2. Homozygous mutation p.Glu144Gln in the CBS gene in proband 1 (a), normal sequence in control subject (b)

асимметрия таза. В 9 лет диагностирован сколиоз грудного отдела позвоночника. Уровень общего гомоцистеина при приеме витамина B6, фолиевой кислоты и бетаина – 110–280 мкмоль/л. В 11 лет у пациента на фоне появления признаков полового созревания отмечен быстрый рост: показатели физического развития достигли 95-го перцентиля. В 12 лет рост, масса тела и окружность головы превышали 97-й перцентиль, интеллектуальное развитие ребенка соответствовало возрасту, мальчик успешно учился в школе для детей с нарушениями зрения, занимался в музыкальной школе по классу фортепиано. Прогрессирования скелетных деформаций зафиксировано не было, по результатам рентгеновской остеоденситометрии поясничного отдела позвоночника и проксимальных отделов бедренных костей обнаружено снижение минеральной плотности костной ткани поясничных позвонков.

При молекулярно-генетическом исследовании у пробанда выявлена миссенс-мутация p.Glu144Gln (NM_001178008.2(CBS):c.430G>C, rs121964966) в гомозиготном состоянии (рис. 2).

Старшая сестра пациента оказалась гетерозиготной носительницей этой мутации.

Семья 2. Пробанд – мальчик, родился в сроке 39 недель от второй беременности с нормальными показателями массы и длины тела. Родители состоят в дальнем родстве. Первая беременность в семье закончилась спонтанным абортom в сроке до 12 недель. На первом году жизни отклонений в развитии ребенка не замечено. В возрасте старше года отмечены варусная деформация голеней, увеличение крупных суставов. Двусторонний подвывих хрусталиков диагностирован в 3 года, в 4 года проведена эмульсификация хрусталика слева и ленсэктомия с имплантацией искусственного хрусталика справа. В 11 лет эндокринологом диагностирована низкорослость. При осмотре генетиком в 11 лет: рост 128 см (менее 3-го перцентиля для данного возраста), масса 29 кг (10-й перцентиль), окружность головы 53 см (50-й перцентиль), умственная отсталость легкой степени, узкое лицо, оттопыренные ушные раковины, высокая спинка носа, дрожание радужки, короткая шея, килевидная деформация грудной клетки, сколиоз, выраженный поясничный лордоз, крупные кисти и стопы, увеличение коленных и голеностопных суставов, ограничение разгибания в межфаланговых суставах, ограничение подвижности в плечевых и коленных суставах, плоскостопие. При аускультации выявлен систолический шум в области сердца, однако при эхокардиографии изменений не было. При ТМС обнаружено повышенное до 92 мкмоль/л содержание метионина (норма 6–43 мкмоль/л), концентрация гомоцистеина составила 387 мкмоль/л. Уровни фолиевой кислоты и витамина B12 были в пределах нормы. Пациенту было назначено лечение пиридоксином в дозе 300 мг/сут. На фоне проводимой терапии уровень гомоцистеина оставался высоким – 150–350 мкмоль/л. От диеты с низким содержанием метионина родители пациента отказались.

При молекулярно-генетическом исследовании у пробанда выявлена миссенс-мутация p.Ala158Val (NM_001178008.2(CBS):c.473C>T, rs1376851289) в гомозиготном состоянии (рис. 3).

Семья 3. Пробанд – мужчина, впервые обследован в возрасте 27 лет. Первый ребенок в семье, родители украинцы, состоят в дальнем родстве. С раннего возраста наблюдался неврологом с диагнозом астено-невротический синдром. В возрасте 3 лет отмечено снижение остроты зрения – миопия, в 9 лет проведена ленсэктомия по поводу подвывиха хрусталиков. С этого возраста у пациента отмечен высокий рост, дефицит массы тела. В возрасте 15–16 лет появились судорожные приступы. При осмотре генетиком в 27 лет: рост 182 см, масса 64 кг, окружность головы 58 см. Констатирована тяжелая умственная отсталость, эмоциональная лабильность, тревожность, нарушения речи (заикание, дизартрия). Телосложение астеническое, лицо удлиненное, антимоноглоидный разрез глаз, большой лоб, вздернутый нос, большие ушные раковины. Грудная клетка без грубых деформаций, сколиотическое нарушение осанки, арахнодактилия кистей и стоп, ограничение разгибания в локтевых, межфаланговых суставах кистей, плоскостопие. При эхокардиографии обнаружен пролапс митрального клапана с регургитацией II степени, дополнительная хорда левого желудочка. Терапевтом диагностирована артериальная гипертензия II–III степени. При ТМС обнаружено повышение концентрации метионина до 60 (норма 6–43 мкмоль/л), концентрация общего гомоцистеина в плазме крови – 364 мкмоль/л, концентрации витамина B12 и фолиевой кислоты в пределах нормы. У 20-летней младшей сестры пробанда со слов родителей: двусторонний подвывих хрусталиков, астено-невротический синдром, судорожные приступы.

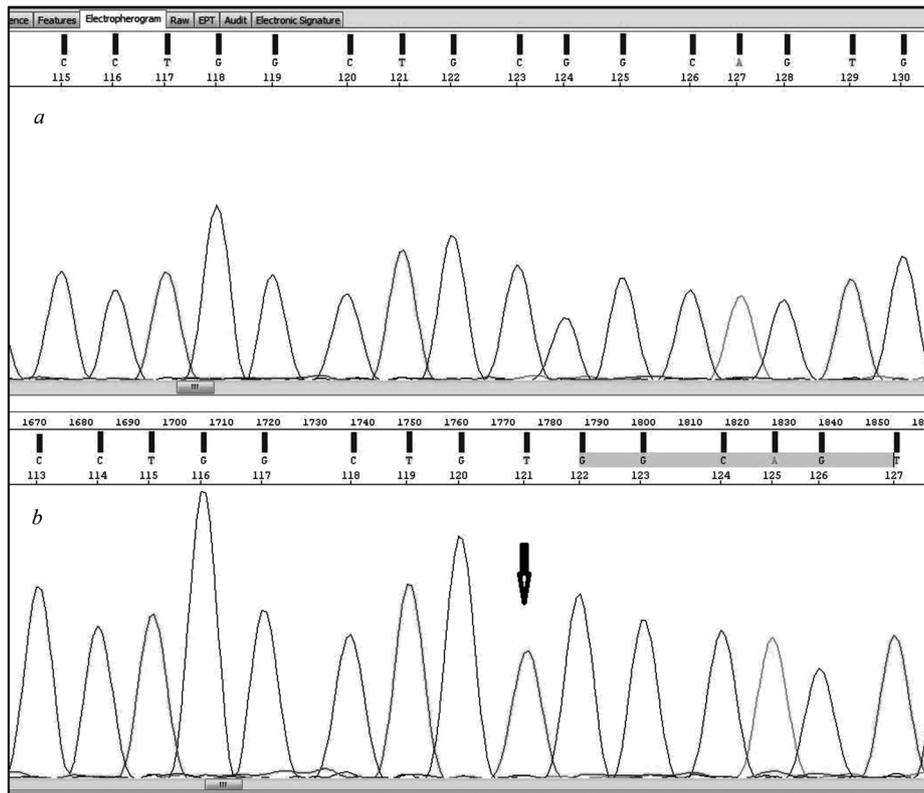


Рис. 3. Мутация p.Ala158Val в гене *CBS* в гомозиготном состоянии у пробанда 2 (b), нормальная последовательность в контрольном образце (a)

Fig. 3. Homozygous mutation p.Ala158Val in the *CBS* gene in proband 2 (b), normal sequence in control subject (a)

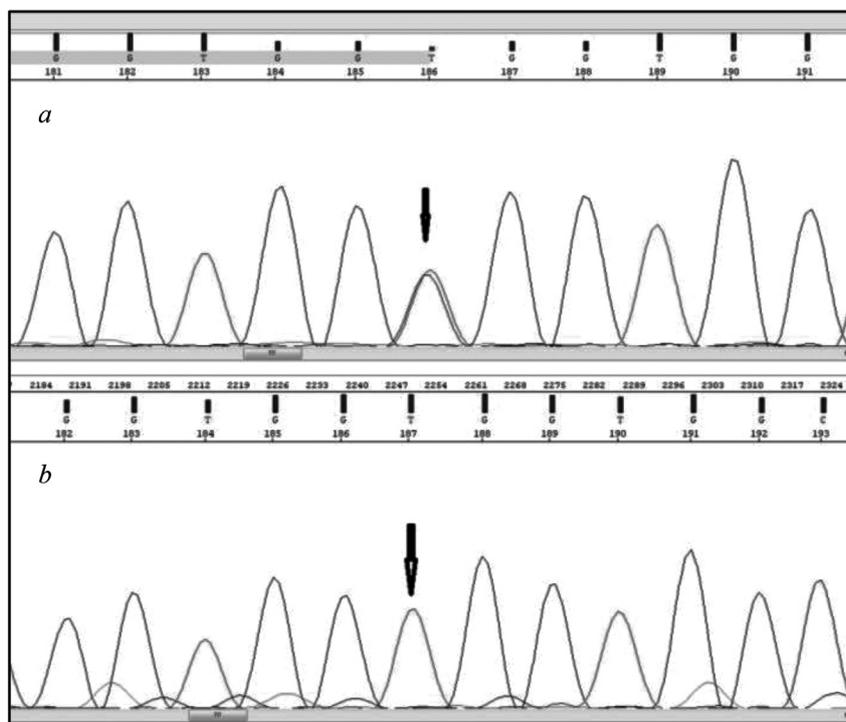


Рис. 4. Мутация p.Ala355Val в гене *CBS* в гетерозиготном состоянии у сестры пробанда 3 (a) и в гомозиготном состоянии у пробанда 3 (b)

Fig. 4. Mutation p.Ala355Val in the *CBS* gene in the heterozygous state in proband's 3 sister (a) and in the homozygous state in proband 3 (b)

Вторая младшая сестра пробанда здорова. После установления пациенту диагноза классической гомоцистинурии по результатам биохимических исследований семью неоднократно приглашали в РНПЦ «Мать и дитя» для назначения лечения и обследования младших сестер пробанда. Для проведения биохимической и молекулярно-генетической диагностики заболевания прибыла только здоровая сестра пациента. Концентрация общего гомоцистеина у нее составила 7,5 мкмоль/л. Другие члены семьи в РНПЦ «Мать и дитя» не явились.

В результате проведенного молекулярно-генетического исследования у пробанда выявлена миссенс-мутация p.Ala355Val (NM_001178008.2(CBS):c.1064C>T, rs772384826) в гомозиготном состоянии. У фенотипически здоровой младшей сестры пациента эта мутация обнаружена в гетерозиготном состоянии (рис. 4).

За 16 лет (с 2004 по 2020 г.) в Беларуси было диагностировано три случая классической гомоцистинурии. У пробандов 1 и 2, которым диагноз был поставлен в возрасте 4 и 11 лет, поводом для обращения к генетику стало врожденное смещение хрусталика. В соответствии с наблюдениями других исследователей дислокация хрусталика является самой частой причиной направления для обследования с целью уточнения диагноза классической гомоцистинурии (85 % случаев), а зачастую – первым симптомом заболевания [1]. Врожденное смещение хрусталика при классической гомоцистинурии крайне редко описывают у пациентов моложе 2 лет, однако у более чем 50 % пациентов с пиридоксин-резистентной формой в отсутствие лечения к 10 годам диагностируется подвывих хрусталика [7]. В описываемых случаях дислокация хрусталика была выявлена в возрасте 3–9 лет, двум пробандам была выполнена лентэктомия. Смещение хрусталика при классической гомоцистинурии является обычно двусторонним и происходит в направлении книзу и назально. Кроме смещения хрусталика при этом заболевании отмечались миопия высокой степени (у всех наших пациентов), а также глаукома, атрофия зрительных нервов, катаракта, дегенерация и отслойка сетчатки, аномалии роговицы [7, 13].

Задержка развития – нередко первый симптом классической гомоцистинурии. По сведениям Mudd с соавт. [7], коэффициент интеллекта (IQ) у пациентов варьируется от 10 до 138 (в среднем 64 при пиридоксин-резистентной форме и 78 при пиридоксин-чувствительной). Однако при условии ранней диагностики и при поддержании уровня общего гомоцистеина на уровне менее 100–120 мкмоль/л интеллектуальное развитие пациентов с витамин В6-резистентной формой оказывается нормальным [14]. В нашем исследовании у пробанда 1 интеллектуальное развитие соответствовало возрасту, умственная отсталость легкой и тяжелой степени была констатирована у пробандов 2 и 3. У пробанда 3 и, со слов родителей, у его сестры отмечены также судорожные приступы, которые, по данным Mudd с соавт. [7], при отсутствии лечения манифестируют к 12 годам у 20 % пациентов с классической гомоцистинурией. Кроме того, у членов семьи 3 отмечены невротические расстройства. Расстройства личности и поведения (депрессия, агрессия, алкогольная зависимость), обсессивно-компульсивное расстройство, психозы наблюдаются у 51 % пациентов [1, 7].

Тромбозы артериальных и венозных сосудов, которые в 70 % случаев становятся причиной смерти пациентов с классической гомоцистинурией [7], у наших пациентов зарегистрированы не были. Тромботические осложнения (в большинстве случаев окклюзии вен) могут развиваться в любом возрасте, чаще на 2–3-й декаде жизни, и иногда являются единственным проявлением заболевания, особенно при легкой пиридоксин-зависимой форме, обусловленной гомозиготным носительством p.Le278Thr [17]. Развитие тромбозов у пациентов с классической гомоцистинурией часто ассоциировано с влиянием различных факторов риска: хирургическим вмешательством, беременностью, носительством Лейденской мутации. Результаты обследования нами всех пробандов на наличие Лейденской мутации и мутации G20210A в гене протромбина показали, что пациенты имеют нормальный генотип. В определенной степени это свидетельствует о благоприятном прогнозе в отношении возникновения спонтанных тромботических осложнений у наших пациентов.

Изменения со стороны скелета (остеопения, остеопороз, высокий рост, долихостеномелия, арахнодактилия, деформация грудной клетки и позвоночника, вальгусная установка коленных суставов) чаще выявляют у пациентов с витамин В6-резистентной формой заболевания, как правило, с началом пубертата [7, 14]. Остеопороз является специфическим проявлением классиче-

ской гомоцистинурии. К подростковому возрасту его диагностируют у 50–70 % пациентов [7]. В описываемых случаях типичные для классической гомоцистинурии скелетные аномалии были обнаружены у пробандов 1 (высокий рост, долихостеномелия, деформация позвоночника, признаки остеопороза при денситометрии) и 3 (арахнодактилия, деформация позвоночника). У пробанда 2 диагностирована не характерная для этого заболевания низкорослость. У пробандов 1 и 2 отмечено увеличение лучезапястных, коленных и голеностопных суставов – признак, который не упоминается в описании фенотипа пациентов с классической гомоцистинурией в доступных нам источниках.

В клинических рекомендациях по лечению и диагностике гомоцистинурии, изданных в 2017 г. в России, в качестве скринингового теста рекомендовано использовать пробу на серосодержащие аминокислоты (качественную реакцию с цианиднитропруссидом) [13]. С помощью этого теста и был выявлен пробанд 1. Далее диагноз гомоцистинурии у этого пациента был подтвержден результатами тонкослойной хроматографии аминокислот мочи (обнаружены гомоцистеин и метионин) и исследования концентрации общего гомоцистеина в плазме крови. Количественное определение метионина методом ТМС, которое рекомендуется российскими авторами как диагностический тест, с 2006 г. в РНПЦ «Мать и дитя» является частью рутинного исследования, включающего измерение концентраций различных аминокислот и ацилкарнитинов, которое выполняется всем пациентам с подозрением на наследственную патологию обмена веществ. При гомоцистинурии, обусловленной дефектами реметилирования, уровень метионина остается нормальным или снижается, в связи с чем определение концентрации общего гомоцистеина для диагностики различных форм этого заболевания предпочтительнее. В нашем центре этот тест проводится всем лицам с врожденным смещением хрусталика, тромбозами артериальных и венозных сосудов и другими симптомами, позволяющими предположить диагноз гомоцистинурии. Пробандам 2 и 3 диагноз был поставлен на основании количественных исследований общего гомоцистеина и метионина, которые были выполнены параллельно.

Пробандам 1 и 2 была назначена терапия, направленная на снижение концентрации гомоцистеина. Пациенту 1 лечение проводилось пиридоксином в сочетании с бетаином и фолиевой кислотой. Пациент 2 получал только пиридоксин.

Пиридоксин – препарат первой линии в лечении классической гомоцистинурии [14]. В зависимости от ответа на терапию пиридоксином различают пиридоксин-чувствительную, пиридоксин-резистентную и частично-чувствительную к пиридоксину формы заболевания. Алгоритм определения чувствительности к пиридоксину описан Morris с соавт. [14] в международных рекомендациях по диагностике и лечению гомоцистинурии, обусловленной недостаточностью цистатионин-β-синтазы. У наших пациентов уровень гомоцистеина на фоне применения пиридоксина снижался, но все же оставался достаточно высоким, что позволило нам классифицировать форму заболевания у них как частично-чувствительную.

Большинство исследователей в области гомоцистинурии считают, что чувствительность к терапии пиридоксином определяется характером мутаций в гене *CBS*: мутации, при которых остаточная активность фермента в культуре фибробластов не определяется или очень низкая, приводят к развитию витамин В6-резистентной формы заболевания. При достаточно высокой остаточной активности цистатионин-β-синтазы диагностируют, как правило, пиридоксин-чувствительную форму.

У пробанда 1 была выявлена мутация с.430G>C в гомозиготном состоянии. Замена гуанина на цитозин в положении 430 приводит к замещению высококонсервативного остатка глутаминовой кислоты в кодоне 144 на глутамин. В базе данных gnomAD Exomes этот вариант зарегистрирован только в популяции стран Европы (частота 0,014 %). Мутация не упоминается в доступных нам опубликованных работах, посвященных классической гомоцистинурии, однако зарегистрирована в базе данных ClinVar в 2018 г. у пациента с классической гомоцистинурией как вариант с неопределенной клинической значимостью единственным субъектом Invitae. Мы полагаем, что замену p.Glu144Gln на основании критериев, предложенных для интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования [18], следует расценивать как вероятно патогенную (см. таблицу).

Оценка патогенности вариантов в гене *CBS*
Assessment of the pathogenicity of variants in the *CBS* gene

Вариант	Оценка	Критерии
p.Glu144Gln	Вероятно, патогенный вариант (PM1 + PM2 + PM5 + PP2 + PP3)	Вариант расположен в «горячей точке» гена <i>CBS</i> , в которой не описаны доброкачественные изменения (PM1) В контрольной выборке gnomAD Exomes вариант зарегистрирован с частотой менее 0,5 % (PM2) Ранее в этом кодоне описан вариант, классифицированный как патогенный – p.Glu144Lys (PM5) Миссенс-варианты в гене <i>CBS</i> обычно вызывают заболевание, доброкачественные варианты встречаются редко (PP2) Алгоритмы предсказания патогенности <i>in silico</i> (DANN, DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, M-CAP, MVP, MutationTaster, REVEL, SIFT) подтверждают патогенность варианта (PP3)
p.Ala158Val	Вероятно, патогенный вариант (PM1 + PM2 + PP2 + PP3)	Вариант расположен в «горячей точке» гена <i>CBS</i> , в которой не описаны доброкачественные изменения (PM1) Вариант не зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD Exomes (PM2) Миссенс-варианты в гене <i>CBS</i> обычно вызывают заболевание, доброкачественные варианты встречаются редко (PP2) Алгоритмы предсказания патогенности <i>in silico</i> (DANN, MutationTaster, SIFT и др.) подтверждают патогенность варианта (PP3)
p.Ala355Val	Вариант с неопределенной клинической значимостью (PM1 + PM2 + PP2 + BP4)	Вариант расположен в «горячей точке» гена <i>CBS</i> , в которой не описаны доброкачественные изменения (PM1) Вариант не зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD Exomes (PM2) Миссенс-варианты в гене <i>CBS</i> обычно вызывают заболевание, доброкачественные варианты встречаются редко (PP2) Результаты шести программ предсказания патогенности <i>in silico</i> (DANN, DEOGEN2, EIGEN, MVP, REVEL, SIFT) подтверждают отсутствие воздействия на ген или генный продукт, результаты трех программ (FATHMM-MKL, M-CAP, MutationTaster) оценивают вариант как патогенный (BP4)

Примечательно, что патогенная замена в том же кодоне – p.Glu144Lys (NM_000071.2(*CBS*):c.430G>A, rs121964966) – занимает 14-е место среди 25 наиболее распространенных в мире мутантных аллелей гена *CBS*, несмотря на то что, по данным gnomAD Exomes, ее частота в популяции стран Европы составляет 0,004 %, что в 3,5 раза меньше частоты p.Glu144Gln [5]. Миссенс-вариант p.Glu144Lys является относительно частой причиной классической гомоцистинурии в Австралии (10 % от всех мутантных аллелей), Германии (8 %), Чехии, Словакии и Англии (3 %), но не описан ни в Польше, ни в России [5]. В доступных нам сообщениях мутация p.Glu144Lys описана только в компаунд-гетерозиготном состоянии у пациентов легкими, умеренно выраженными и тяжелыми проявлениями пиридоксин-чувствительной и пиридоксин-резистентной классической гомоцистинурии [19–23]. Тяжесть клинических проявлений и зависимость от пиридоксина в этих ситуациях определялись вторым мутантным аллелем. При изучении экспрессии p.Glu144Lys в клетках *E. coli* активность мутантной формы цистатионин-β-синтазы составляла 0,1 % в сравнении с ферментом дикого типа, что предполагает развитие витамин B6-резистентной формы заболевания у гомозиготных носителей [20–23]. Таким образом, у нашего пациента следовало ожидать отсутствия чувствительности к пиридоксину. Тем не менее, концентрация общего гомоцистеина в начале терапии пиридоксином у него существенно снизилась. По нашему мнению, это свидетельствует о сохранении определенной остаточной активности фермента, обусловленной сходством физико-химических свойств глутамин и глутаминовой кислоты.

Пробанд 2 являлся гомозиготным носителем мутации c.473C>T. Замена цитозина на тимин в позиции 473 приводит к замещению остатка аланина в кодоне 158 на валин. Этот миссенс-вариант не зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD Exomes и не упоминается в базе данных ClinVar. В доступных источниках нами обнаружено две публикации, в которых упоминается

этот вариант: Shan и Kruger в 1998 г. в эксперименте на культуре грибов показали, что мутации, вызывающие образование преждевременного стоп-кодона и приводящие к синтезу фермента, лишённого последних 145 аминокислотных остатков С-концевого регуляторного домена, восстанавливают активность цистатионин-β-синтазы при некоторых мутациях, обнаруженных у пациентов с гомоцистинурией, если находятся с ними в *cis*-положении [24]. Среди изученных авторами вариантов упоминается и замена Ala158Val. В 2015 г. Gong с соавт. [16] выявили эту мутацию в сочетании с миссенс-вариантом с.407T>C (р. Leu136Pro) у трех sibсов из одной семьи в Китае. У всех пациентов наблюдались типичные проявления классической гомоцистинурии: двустороннее смещение хрусталика, миопия, роговичная стафилома, глаукома, экзотропия, отслойка сетчатки, скелетные деформации (кифосколиоз, килевидная деформация грудной клетки, арахнодактилия), пирамидные знаки, атаксия, нестабильная походка, атрофические изменения головного мозга, эритема лица, умственная отсталость, увеличение концентрации гомоцистеина до 86–103 мкмоль/л и метионина до 287–345 мкмоль/л (при норме 20–40 мкмоль/л) в крови [16]. Авторы не сообщили, получали ли пациенты лечение пиридоксинам. Тем не менее, учитывая, что концентрация общего гомоцистеина в описанных ими случаях была невысокой, можно предположить, что оба варианта ассоциируются с сохраненной остаточной активностью фермента. Это соответствует и нашим наблюдениям частичной чувствительности к пиридоксину у пробанда 2. По совокупности сведений вариант р. Ala158Val классифицирован нами как вероятно-патогенный (см. таблицу).

У пробанда 3 была обнаружена мутация с.1046C>T в гомозиготном состоянии. Замена цитозина на тимин в положении 1064 приводит к замещению остатка аланина на валин в кодоне 355. Этот миссенс-вариант не зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD Exomes, но отмечен в базе данных ClinVar как вариант с неопределенной клинической значимостью, выявленный у двух пациентов. Заявитель – EGL Genetic Diagnostics (Eurofins Clinical Diagnostics) не предоставил никакой дополнительной информации об этих лицах. Нам удалось найти только одну публикацию, в которой упоминается мутация Ala355Val. Echaniz-Laguna с соавт. [25] в 2018 г. сообщили о необычном случае обратимой периферической нейропатии, возникшей в результате длительного приема больших (1250–1750 мг/сут) доз пиридоксина у компаундной гетерозиготной носительницы Ala355Val/Ile278Thr. К сожалению, исследователи не привели описания фенотипа пациентки. При оценке патогенности замены р. Ala355Val *in silico* были получены противоречивые результаты: программы DANN, DEOGEN2, EIGEN, MVP, REVEL, SIFT отметили отсутствие воздействия на ген или генный продукт, инструменты FATHMM-MKL, M-CAP и MutationTaster определили вариант как патогенный. Таким образом, с учетом сведений о распространенности мутации р. Ala355Val, неоднозначных оценок патогенности варианта с помощью компьютерных программ и невозможности уточнить генотип сестры пробанда 3, страдающей аналогичным заболеванием, замена р. Ala355Val нами классифицирована как вариант с неопределенной клинической значимостью (см. таблицу).

Заключение. Классическая гомоцистинурия – весьма редкое заболевание в Республике Беларусь. Все случаи заболеваемости в Беларуси обусловлены очень редкими мутациями, не зарегистрированными в граничащих с республикой странах, и являются следствием браков между родственниками или уроженцами одной местности. Нами впервые описаны фенотипические проявления мутаций р. Glu144Gln и р. Ala355Val, расширено описание спектра клинических проявлений замены Ala158Val, проведена оценка клинической значимости выявленных вариантов в соответствии с современными критериями.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Three main causes of homocystinuria: CBS, cblC and MTHFR deficiency. What do they have in common? / G. R. W. Hoss [et al.] // J. Inborn Errors Metab. Screen. – 2019. – Vol. 7. – P. e20190007. <https://doi.org/10.1590/2326-4594-jiem-2019-0007>
2. Клинико-генетические аспекты и патогенетические механизмы классической гомоцистинурии у детей / А. Н. Семякина [и др.] // Рос. вестн. перинатол. и педиатр. – 2013. – Т. 58, № 3. – С. 30–37.
3. Uhlendorf, B. W. Cystathionine synthase in tissue culture derived from human skin: enzyme defect in homocystinuria / B. W. Uhlendorf, H. Mudd // Science. – 1968. – Vol. 160, N 3831. – P. 1007–1009. <https://doi.org/10.1126/science.160.3831.1007>

4. The gene for cystathionine beta-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17 / M. Münke [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1988. – Vol. 42, N 4. – P. 550–559.
5. Classical homocystinuria: f common inborn error of metabolism? An epidemiological study based on genetic databases / G. R. Weber Hoss [et al.] // *Mol. Genet. Genom. Med.* – 2020. – Vol. 8, N 6. – P. e1214. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1214>
6. *In silico* and *in vivo* models for Qatari-specific classical homocystinuria as basis for development of novel therapies / H. M. Ismail [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2019. – Vol. 40, N 2. – P. 230–240. <https://doi.org/10.1002/humu.23682>
7. Mudd, S. H. Disorders of transsulfuration / S. H. Mudd, H. L. Levy, J. P. Kraus // *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* – New York, McGraw-Hil, 2001. – P. 2007–2056.
8. Diversity of cystathionine beta-synthase haplotypes bearing the most common homocystinuria mutation c. 833T>C: a possible role for gene conversion / P. Vyletal [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2007. – Vol. 28, N 3. – P. 255–264. <https://doi.org/10.1002/humu.20430>
9. Regulation of 3' splice site selection in the 844ins68 polymorphism of the cystathionine beta-synthase gene / M. Romano [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 46. – P. 43821–43829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208107200>
10. A common 844ins68 insertion variant in the cystathionine beta-synthase gene / L. A. Kluijtmans [et al.] // *Biochem. Mol. Med.* – 1997. – Vol. 62, N 1. – P. 23–25.
11. CBS mutations are good predictors for B6-responsiveness: a study based on the analysis of 35 Brazilian classical homocystinuria patients / S. Poloni [et al.] // *Mol. Genet. Genom. Med.* – 2018. – Vol. 6, N 2. – P. 160–170. <https://doi.org/10.1002/mgg3.342>
12. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency in Russia: molecular and clinical characterization / E. Voskoboeva [et al.] // *Mol. Gen. Metab. Rep.* – 2017. – Vol. 14. – P. 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.11.001>
13. Гомоцистинурия у детей / А. А. Баранов [и др.] // *Вопр. совр. педиатр.* – 2017. – Т. 16, № 6. – С. 457–467.
14. Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency / A. A. Morris [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2017. – Vol. 40, N 1. – P. 49–74. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9979-0>
15. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion / H. Refsum [et al.] // *Clin. Chem.* – 2004. – Vol. 50, N 1. – P. 3–32. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.021634>
16. Novel compound heterozygous CBS mutations cause homocystinuria in a Han Chinese family / B. Gong [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5, N 1. – P. 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep17947>
17. Vascular presentation of cystathionine betasynthase deficiency in adulthood / M. Magner [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2011. – Vol. 34, N 1. – P. 33–37. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9146-y>
18. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) / О. П. Рыжкова [и др.] // *Мед. генетика.* – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 3–23.
19. A missense mutation (I278T) in the cystathionine beta-synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype / V. E. Shih [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1995. – Vol. 57, N 1. – P. 34–39.
20. Characterisation of five missense mutations in the cystathionine beta-synthase gene from three patients with B6-nonresponsive homocystinuria / P. A. Dawson [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 1997. – Vol. 5, N 1. – P. 15–21.
21. Mutational analysis of the cystathionine beta-synthase gene: a splicing mutation, two missense mutations and an insertion in patients with homocystinuria. Mutations in brief no. 120. Online / R. B. Gordon [et al.] // *Hum. Mutat.* – 1998. – Vol. 11, N 4. – P. 332. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)11:4<332::AID-HUMU120>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:4<332::AID-HUMU120>3.0.CO;2-1)
22. Impaired heme binding and aggregation of mutant cystathionine beta-synthase subunits in homocystinuria / M. Janosik [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 68, N 6. – P. 1506–1513. <https://doi.org/10.1086/320597>
23. The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Australian patients: genotype-phenotype correlations and response to treatment / M. Gaustadnes [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2002. – Vol. 20, N 2. – P. 117–126. <https://doi.org/10.1002/humu.10104>
24. Shan, X. Correction of disease-causing CBS mutations in yeast / X. Shan, W. D. Kruger // *Nat. Genet.* – 1998. – Vol. 19, N 1. – P. 91–93. <https://doi.org/10.1038/ng0598-91>
25. Regressive pyridoxine-induced sensory neuronopathy in a patient with homocystinuria / A. Echaniz-Laguna [et al.] // *BMJ Case Rep.* – 2018. – Vol. 2018. – P. bcr2018225059d. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-225059>

References

1. Hoss G. R. W., Poloni S., Blom H. J., Shewartz I. V. D. Three main causes of homocystinuria: CBS, cblC and MTHFR deficiency. What do they have in common? *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening*, 2019, vol. 7, p. e20190007. <https://doi.org/10.1590/2326-4594-jiems-2019-0007>
2. Semyachkina A. N., Voskoboeva E. Yu., Voinova V. Yu., Kurbatov M. B., Novikova I. M., Zakharova E. Yu., Novikov P. V. The clinical and genetic aspects and pathogenic mechanisms of classical homocystinuria in children. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii* [Russian bulletin of perinatology and pediatrics], 2013, vol. 58, no. 3, pp. 30–37 (in Russian).
3. Uhlendorf B. W., Mudd H. Cystathionine synthase in tissue culture derived from human skin: enzyme defect in homocystinuria. *Science*, 1968, vol. 160, no. 3831, pp. 1007–1009. <https://doi.org/10.1126/science.160.3831.1007>
4. Münke M., Kraus J. P., Ohura T., Francke U. The gene for cystathionine beta-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. *American Journal of Human Genetics*, 1988, vol. 42, no. 4, pp. 550–559.

5. Weber Hoss G. R., Sperb-Ludwig F., Schwartz I. V. D., Blom H. J. Classical homocystinuria: f common inborn error of metabolism? An epidemiological study based on genetic databases. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2020, vol. 8, no. 6, p. e1214. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1214>
6. Ismail H. M., Krishnamoorthy N., Al-Dewik N., Zayed H., Mohamed N. A., Di Giacomo V. [et al.]. *In silico* and *in vivo* models for Qatari-specific classical homocystinuria as basis for development of novel therapies. *Human Mutation*, 2019, vol. 40, no. 2, pp. 230–240. <https://doi.org/10.1002/humu.23682>
7. Mudd S. H., Levy H. L., Kraus J. P. Disorders of transsulfuration. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, 2001, pp. 2007–2056.
8. Vyletal P., Sokolová J., Cooper D. N., Kraus J. P., Krawczak M., Pepe G., Kozich V. Diversity of cystathionine beta-synthase haplotypes bearing the most common homocystinuria mutation c. 833T>C: a possible role for gene conversion. *Human Mutation*, 2007, vol. 28, no. 3, pp. 255–264. <https://doi.org/10.1002/humu.20430>
9. Romano M., Marcucci R., Buratti E., Ayala Y. M., Sebastio G., Baralle F. E. Regulation of 3' splice site selection in the 844ins68 polymorphism of the cystathionine beta-synthase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 46, pp. 43821–43829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208107200>
10. Kluijtmans L. A., Boers G. H., Trijbels F. J., van Lith-Zanders H. M., van den Heuvel L. P., Blom H. J. A common 844ins68 insertion variant in the cystathionine beta-synthase gene. *Biochemical and Molecular Medicine*, 1997, vol. 62, no. 1, pp. 23–25.
11. Poloni S., Sperb-Ludwig F., Borsatto T., Hoss G. W., Doriqui M. Ju. R., Embiruçu E. K. [et al.]. CBS mutations are good predictors for B6-responsiveness: a study based on the analysis of 35 Brazilian classical homocystinuria patients. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 2018, vol. 6, no. 2, pp. 160–170. <https://doi.org/10.1002/mgg3.342>
12. Voskoboeva E., Semyachkina A., Yablonskaya M., Nikolaeva E. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency in Russia: molecular and clinical characterization. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 2017, vol. 14, pp. 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.11.001>
13. Baranov A. A., Namazova-Baranova L. S., Borovik T. E., Bushueva T. V., Globa O. V., Zhurkova N. V. [et al.]. Homocystinuria in children. *Voprosy sovremennoi pediatrii* [Current pediatrics], 2017, vol. 16, no. 6, pp. 457–467 (in Russian).
14. Morris A. A., Kožich V., Santra S., Andria G., Ben-Omran T. I., Chakrapani A. B. [et al.]. Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2017, vol. 40, no. 1, pp. 49–74. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9979-0>
15. Refsum H., Smith A. D., Ueland P. M., Nexø E., Clarke R., McPartlin J. [et al.]. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clinical Chemistry*, 2004, vol. 50, no. 1, pp. 3–32. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.021634>
16. Gong B., Liu L., Li Z., Ye Z., Xiao Y., Zeng G. [et al.]. Novel compound heterozygous CBS mutations cause homocystinuria in a Han Chinese family. *Scientific Reports*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep17947>
17. Magner M., Krupková L., Honzík T., Zeman J., Hyánek J., Kožich V. Vascular presentation of cystathionine beta-synthase deficiency in adulthood. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011, vol. 34, no. 1, pp. 33–37. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9146-y>
18. Ryzhkova O. P., Kardymon O. L., Prokhorchuk E. B., Konovalov F. A., Maslennikov A. B., Stepanov V. A. [et al.]. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2. *Meditinskaya genetika* [Medical genetics], 2019, vol. 18, no. 2, pp. 3–23 (in Russian).
19. Shih V. E., Fringer J. M., Mandell R., Kraus J. P., Berry G. T., Heidenreich R. A., Korson M. S., Levy H. L., Ramesh V. A missense mutation (I278T) in the cystathionine beta-synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype. *American Journal of Human Genetics*, 1995, vol. 57, no. 1, pp. 34–39.
20. Dawson P. A., Cox A. J., Emmerson B. T., Dudman N. P., Kraus J. P., Gordon R. B. Characterisation of five missense mutations in the cystathionine beta-synthase gene from three patients with B6-nonresponsive homocystinuria. *European Journal of Human Genetics*, 1997, vol. 5, no. 1, pp. 15–21.
21. Gordon R. B., Cox A. J., Dawson P. A., Emmerson B. T., Kraus J. P., Dudman N. P. Mutational analysis of the cystathionine beta-synthase gene: a splicing mutation, two missense mutations and an insertion in patients with homocystinuria. Mutations in brief no. 120. Online. *Human Mutation*, 1998, vol. 11, no. 4, p. 332. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)11<332::AID-HUMU120>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11<332::AID-HUMU120>3.0.CO;2-1)
22. Janosík M., Oliveriusová J., Janosíková B., Sokolová J., Kraus E., Kraus J. P., Kožich V. Impaired heme binding and aggregation of mutant cystathionine beta-synthase subunits in homocystinuria. *American Journal of Human Genetics*, 2001, vol. 68, no. 6, pp. 1506–1513. <https://doi.org/10.1086/320597>
23. Gaustadnes M., Wilcken B., Oliveriusova J., McGill J., Fletcher J., Kraus J. P., Wilcken D. E. The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Australian patients: genotype-phenotype correlations and response to treatment. *Human Mutation*, 2002, vol. 20, no. 2, pp. 117–126. <https://doi.org/10.1002/humu.10104>
24. Shan X., Kruger W. D. Correction of disease-causing CBS mutations in yeast. *Nature Genetics*, 1998, vol. 19, no. 1, pp. 91–93. <https://doi.org/10.1038/ng0598-91>
25. Echaniz-Laguna A., Mourot-Cottet R., Noel E., Chanson J.-B. Regressive pyridoxine-induced sensory neuronopathy in a patient with homocystinuria. *BMJ Case Reports*, 2018, vol. 2018, p. bcr2018225059d. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-225059>

Информация об авторах

Гусина Ася Александровна – канд. мед. наук, ведущий лабораторией. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: asya.gusina@mail.ru

Information about the authors

Asya A. Gusina – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific Practical Centre “Mother and child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: asya.gusina@mail.ru

Зиновик Александр Валентинович – заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alizi@yandex.ru

Наумчик Ирина Всеволодовна – канд. мед. наук, заместитель директора по медицинской генетике. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: belgenetics@yahoo.com

Кулак Виктория Дмитриевна – врач-генетик. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulak.vd@mail.ru

Мотюк Ирина Николаевна – врач-генетик, главный внештатный специалист по медицинской генетике главного управления здравоохранения Гродненского областного исполнительного комитета. Гродненский областной клинический перинатальный центр (ул. Горького, 77, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: imotyuk@mail.ru

Бойша Анна Станиславовна – врач-генетик. Могилевский областной лечебно-диагностический центр (ул. Первомайская, 59а, 212030, г. Могилев, Республика Беларусь). E-mail: gen@modc.by

Мясников Святослав Олегович – врач лабораторной диагностики. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: svyatoslavm@bk.ru

Сталыбко Анастасия Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastyastalybko@gmail.com

Гусина Нина Борисовна – канд. биол. наук, врач лабораторной диагностики. Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nina.gusina@tut.by

Aliaksandr V. Zinovik – Head of the Laboratory. Republican Scientific Practical Centre “Mother and child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alizi@yandex.ru

Irina V. Naumchik – Ph. D. (Med.), Deputy Director for Medical Genetics. Republican Scientific Practical Centre “Mother and child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: belgenetics@yahoo.com

Victoria D. Kulak – geneticist. Republican Scientific Practical Centre “Mother and child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulak.vd@mail.ru

Irina N. Motiuk – geneticist, Chief Freelance Specialist in Medical Genetics of the Main Health Department of the Grodno Regional Executive Committee. Grodno Regional Clinical Perinatal Center (77, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: imotyuk@mail.ru

Anna S. Boisha – geneticist. Mogilev Regional Treatment and Diagnostic Center (59a, Pervomayskaya Str., 212030, Mogilev, Republic of Belarus). E-mail: gen@modc.by

Svyatoslav O. Miasnikov – doctor of laboratory diagnostics. Republican Scientific Practical Centre “Mother and child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svyatoslavm@bk.ru

Nastya S. Stalybko – Junior Researcher. Republican Scientific Practical Centre “Mother and child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastyastalybko@gmail.com

Nina B. Gusina – Ph. D. (Biol.), doctor of laboratory diagnostics. Republican Scientific Practical Centre “Mother and child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nina.gusina@tut.by

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616-056.52:577.218
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-62-69>

Поступила в редакцию 17.03.2021
Received 17.03.2021

О. Е. Полулях, Е. И. Калиновская, А. А. Басалай, А. С. Мигалевич

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *Fasn* И *Sirt4* И КОДИРУЕМЫХ ИМИ БЕЛКОВ В ВИСЦЕРАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ ПОТРЕБЛЕНИИ ЖИРОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Аннотация. Представлены результаты собственных исследований изменения экспрессии липогенных генов *Fasn* и *Sirt4* и кодируемых ими белков *Fasn* и *Sirt4* в висцеральной жировой ткани крыс линии Вистар при избыточном потреблении жиров.

В течение 8 недель дополнительно к стандартному рациону вивария крысы получали жиры животного происхождения (45 % от суточной калорийности). Относительную экспрессию генов определяли методом ПЦР в режиме реального времени, содержание белков в висцеральной жировой ткани – методом иммуноферментного анализа.

Установлено, что при избыточном потреблении жиров животного происхождения в висцеральной жировой ткани крыс линии Вистар снижается экспрессия липогенных генов *Fasn* и *Sirt4* и кодируемых ими белков, что свидетельствует о дисфункции жировой ткани, следствием чего может быть нарушение метаболизма липидов и углеводов, развитие инсулинорезистентности.

Ключевые слова: ожирение, экспрессия генов, дисфункция жировой ткани, инсулинорезистентность, метаболические нарушения

Для цитирования: Экспрессия генов *Fasn* и *Sirt4* и кодируемых ими белков в висцеральной жировой ткани крыс линии Вистар при избыточном потреблении жиров животного происхождения / О. Е. Полулях [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 62–69. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-62-69>

Olga Y. Poluliakh, Elena I. Kalinovskaya, Anastasia A. Basalai, Anastasia S. Mihalevich

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

EXPRESSION OF THE *Fasn* AND *Sirt4* GENES AND THE PROTEINS THEY ENCODE IN THE VISCERAL ADIPOSE TISSUE OF WISTAR RATS AGAINST THE BACKGROUND OF EXCESS FAT INTAKE

Abstract. The changes in the expression of the lipogenic *Fasn* and *Sirt4* genes and the *Fasn* and *Sirt4* proteins they encode in the visceral adipose tissue of Wistar rats against the background of excess fat intake were studied.

In addition to the standard vivarium diet, the rats received the animal fats (45 % of daily caloric value) for 8 weeks. A relative gene expression was determined by real-time PCR, protein content in the visceral adipose tissue – by the ELISA method.

It was found that the excess animal fat intake leads to a decreased expression of lipogenic *Fasn* and *Sirt4* genes and the proteins they encode in the visceral adipose tissue of Wistar rats, which indicates the formation of the adipose tissue dysfunction, which may result in the impaired lipid and carbohydrate metabolism, the insulin resistance development.

Keywords: obesity, gene expression, adipose tissue dysfunction, insulin resistance, metabolic disorders

For citation: Poluliakh O. Y., Kalinovskaya E. I., Basalai A. A., Mihalevich A. S. Expression of the *Fasn* and *Sirt4* genes and the proteins they encode in the visceral adipose tissue of Wistar rats against the background of excess fat intake. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 62–69 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-62-69>

Введение. Во всех странах мира наблюдается прогрессирующее увеличение числа лиц с избыточной массой тела и ожирением как среди взрослого, так и среди детского населения. В связи с высокой распространенностью ожирения растет и число связанных с ним соматических заболеваний (сахарного диабета второго типа, артериальной гипертензии, неалкогольной жировой болезни печени, некоторых видов рака и др.), приводящих к ухудшению качества жизни и преждевременной смерти [1].

Образование избыточного количества жировой ткани может быть связано с рядом факторов: наличием нейроэндокринных нарушений, малоподвижным образом жизни, приемом гормональ-

ных препаратов, генетической предрасположенностью. Однако основной причиной этого является дисбаланс между потреблением энергии с пищей и ее расходом. В случае, когда потребление превышает расход, активируется липогенез – избыточный синтез жирных кислот и триглицеридов в печени и жировой ткани, а недостаток питательных веществ стимулирует окисление жиров. Баланс между синтезом и окислением липидов обеспечивает ряд гормонов и ферментов. Среди последних немаловажное значение имеют сиртуины. Они представляют собой семейство высококонсервативных НАД-зависимых белков, обладающих деацетилазной или АДФ-рибозилтрансферазной активностью, мишенями которых являются гистоны, транскрипционные факторы и метаболические ферменты. Основной функцией сиртуинов является адаптация экспрессии генов и метаболической активности к изменению энергетического статуса клетки [2].

На сегодняшний день сиртуин 4 (*Sirt4*) является одним из наименее изученных сиртуинов. Он представляет собой митохондриальный белок, который кодируется геном *Sirt4*. Согласно имеющимся данным, *Sirt4* является регулятором гомеостаза липидов в организме. Он деацетилирует и ингибирует фермент малонил-КоА-декарбоксилазу (MCD), который способствует синтезу ацетил-КоА из малонил-КоА. Последний вызывает липогенез и подавляет окисление жиров. В экспериментах на мышах с нокаутом гена *Sirt4* выявлено повышение активности MCD и снижение уровня малонил-КоА в скелетных мышцах и белой жировой ткани, что обуславливало их устойчивость к ожирению, вызванному диетой. Увеличение экспрессии *Sirt4*, напротив, ассоциируется с усилением липогенеза и снижением окисления жирных кислот. Помимо участия в метаболизме липидов *Sirt4* играет важную роль и в обмене углеводов. Так, в экспериментах на мышах было показано, что нокаут гена *Sirt4* приводит к развитию у них инсулинорезистентности и устойчивости к ожирению [3]. Все это делает его привлекательным для изучения с целью более глубокого понимания процессов, лежащих в основе развития ожирения и связанных с ним осложнений.

Одним из ключевых ферментов липогенеза является также синтаза жирных кислот (*Fasn*), представляющая собой мультиферментный белок, который кодируется геном *Fasn*. Синтаза жирных кислот катализирует синтез *de novo* длинноцепочечных насыщенных жирных кислот из ацетил-КоА и малонил-КоА в присутствии НАДФН. *Fasn* интенсивно экспрессируется в тканях с высокой метаболической активностью (например, тканях печени, жировой ткани и тканях головного мозга). Исследования, проведенные на мышах, показали, что ингибирование экспрессии гена *Fasn* приводит к снижению потребления пищи, быстрому снижению массы тела, уменьшению проявлений стеатогепатоза, вызванного высокожировой диетой [4, 5]. Это дает основания полагать, что *Fasn* может обуславливать избыточное накопление жировой ткани посредством регуляции пищевого поведения и энергетического гомеостаза. На сегодняшний день существует ряд исследований, результаты которых указывают на роль *Fasn* в формировании инсулинорезистентности, дислипидемии, изменении уровня адипокинов в крови [6]. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о том, что синтаза жирных кислот принимает участие в адипогенезе. Так, в экспериментах на крысах было показано, что ингибирование активности *Fasn* приводит к блокированию дифференцировки адипоцитов и сокращению их количества [7].

Согласно результатам эпидемиологических исследований, имеется взаимосвязь между содержанием жиров в рационе и риском развития ожирения [8]. Однако лежащие в основе этого молекулярные механизмы на сегодняшний день до конца не изучены.

Потребление продуктов с высоким содержанием жиров животного происхождения приводит к увеличению содержания жирных кислот в организме, которые являются важными регуляторами экспрессии генов метаболических ферментов в печени. В то же время их роль в жировой ткани изучена недостаточно.

Целью данного исследования являлось изучение влияния жиров животного происхождения на экспрессию генов *Fasn* и *Sirt4* в висцеральной жировой ткани крыс линии Вистар.

Объекты и методы исследования. В эксперименте использовались половозрелые крысы-самцы линии Вистар вивария Института физиологии НАН Беларуси. Животные случайным образом были разделены на две группы и содержались при стандартном световом режиме (12 ч свет/

12 ч темнота) и температуре 22 ± 2 °С. Первая группа (Контроль) состояла из 20 крыс, которые получали стандартный рацион питания вивария. Вторая группа (Диета) включала 30 животных, потреблявших дополнительно к стандартному рациону питания жиры животного происхождения (45 % от суточной калорийности) на протяжении 8 недель [9]. Животных выводили из эксперимента методом декапитации с использованием наркотизирующих средств. Все экспериментальные работы выполнены с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для лабораторных или иных целей, и согласно разрешению комитета по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси.

Неинвазивные методы исследования. Животным измеряли систолическое артериальное давление (САД) неинвазивным методом (non-invasive blood pressure, NIBP) с использованием компьютеризированной установки PanLab (Испания).

Лабораторные методы исследования. Показатели липидного и углеводного обмена (холестерина, липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), глюкозы, триглицеридов) определяли в сыворотке крови животных на биохимическом анализаторе BS-200 (Китай) с использованием реагентов Диасенс (Беларусь). Измерение уровня инсулина в сыворотке крови осуществляли на иммуноферментном анализаторе ChemWell (США) с использованием коммерческих наборов Fine Test (Китай). Концентрации белков Fasn и Sirt определяли в висцеральной жировой ткани крыс. Для этого жировую ткань (50 мг) размораживали, помещали в 500 мкл 0,01 М PBS, pH 7,4, гомогенизировали и центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин. Супернатант отбирали в отдельные пробирки для дальнейшего проведения иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов Sirtuin 4 (Cloud clone corp., Китай) и Rat fatty acid synthase (Fine test, Китай).

Определение экспрессии генов Sirt4 и Fasn в жировой ткани крыс. Висцеральную жировую ткань выделяли во время диссекции и взвешивали на электронных весах Scout Pro (Китай). Затем 100 мг паранефральной жировой ткани помещали в реагент для сохранения стабильности РНК-RNA later (Sigma, США) и хранили при -20 °С. Еще 100 мг паранефрального жира замораживали при -80 °С без стабилизатора.

Экспрессию генов *Sirt4* и *Fasn* определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (RT-PCR). Для выделения РНК использовали набор Total RNA kit II (Omega, США). В 1 мл лизирующего раствора RNA-Solv® с добавлением 2-меркаптоэтанола помещали 30 мг жировой ткани и гомогенизировали с помощью диспергатора ИКА Т 10 basic ULTRA-TURRAX. После добавления хлороформа гомогенат разделяли на водную и органическую фазы путем центрифугирования. Водную фазу, содержащую РНК, доводили этанолом и наносили на мини-колонки HiBind® RNA, с которыми происходило связывание РНК, а затем проводили отмывку. Выделенную РНК элюировали водой, очищенной от РНКаз. Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора MMLVRTkit (Evrogen, Россия) с использованием рандомного декануклеотидного праймера Random (dN)10. Концентрацию кДНК измеряли на флуориметре Quantus fluoremeter (Promega, США). Для проведения амплификации использовали праймеры и зонды TaqMan, а также реакционную смесь TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, США). Все реакции ПЦР в режиме реального времени осуществляли на амплификаторе Quant Studio 5 (Applied Biosystems, США) согласно протоколу. В качестве эндогенного контроля был выбран бета-актин (*Actb*). Уровень экспрессии генов *Sirt1* и *Fasn* оценивали относительно уровня экспрессии эндогенного контроля в данном образце по стандартной формуле $RE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, где RE – уровень относительной экспрессии искомого гена, $\Delta\Delta Ct$ – разница циклов, во время которых кривые накопления *Actb* данного образца и анализируемого гена пересекают пороговую линию.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 7.0. Нормальность распределения определяли с помощью теста Шапиро–Уилка. Параметрические данные представляли в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$), достоверность различий рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Непараметрические данные были представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей (Me [25 %; 75 %]), достоверность различий рассчитывали с помощью

U-критерия Манна–Уитни. Наличие связи между показателями устанавливали с помощью ранговой корреляции Спирмена (Spearman R). Достоверным считали уровень значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При избыточном потреблении жиров животного происхождения у крыс линии Вистар выявлено достоверное повышение уровня САД, увеличение массы тела и содержания висцеральной жировой ткани (табл. 1), что указывает на развитие у них алиментарного ожирения и артериальной гипертензии. В сыворотке крови обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) повышение уровней триглицеридов, глюкозы и инсулина, отмечено увеличение индекса Нома (табл. 2). Выявленные изменения свидетельствуют о нарушении липидного и углеводного обмена, развитии инсулинорезистентности у животных группы Диета.

Таблица 1. Показатели САД, массы тела и висцеральной жировой ткани у крыс линии Вистар при избыточном потреблении жиров животного происхождения (M ± m)

Table 1. Indicators of SBP, body weight and visceral adipose tissue in Wistar rats on a diet high in animal fats (M ± m)

Параметр	Группа животных	
	Контроль (n = 20)	Диета (n = 30)
САД, мм рт. ст.	131 ± 1,38	158 ± 2,08*
Масса животного, г	363 ± 6,50	444 ± 8,60*
Масса висцеральной жировой ткани, г	5,40 ± 1,45	19,48 ± 8,13*

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: * – достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

Таблица 2. Показатели липидного и углеводного обмена у крыс линии Вистар при избыточном потреблении жиров животного происхождения (Me [25 %; 75 %])

Table 2. Indicators of lipid and carbohydrate metabolism in Wistar rats on a diet high in animal fats (Me [25 %; 75 %])

Показатель	Группа животных	
	Контроль (n = 20)	Диета (n = 30)
Холестерин, ммоль/л	1,59 [1,37; 1,79]	1,41 [1,31; 1,60]
Триглицериды, ммоль/л	0,66 [0,56; 1,04]	1,09 [0,89; 1,38]*
ЛПВП, ммоль/л	0,77 [0,64; 0,85]	0,69 [0,63; 0,83]
ЛПНП, ммоль/л	0,44 [0,37; 0,50]	0,39 [0,33; 0,44]
Глюкоза, ммоль/л	6,70 [6,33; 6,97]	8,23 [7,90; 8,63]*
Инсулин, мкМЕ/мл	251,50 [225,50; 276,00]	277,00 [247,00; 302,00]*
Индекс Нома	73,43 [66,87; 79,69]	102,43 [89,25; 110,52]*

Изменение относительной экспрессии генов *Sirt4* и *Fasn* и содержания кодируемых ими белков в висцеральной жировой ткани представлены в табл. 3. Как видно из таблицы, у крыс, потреблявших избыточное количество жиров животного происхождения, произошло снижение относительной экспрессии липогенных генов *Sirt 4* и *Fasn* в висцеральной жировой ткани. В отношении гена *Fasn* изменения носили достоверный характер ($p < 0,05$). Достоверно уменьшилось также содержание белков *Sirt4* и *Fasn*. Причем обнаружена отрицательная корреляционная зависимость между массой тела животного, количеством висцерального жира и экспрессией генов *Sirt 4* и *Fasn* и кодируемых ими белков (табл. 4).

Данные результаты могут свидетельствовать о том, что длительное избыточное потребление продуктов с высоким энергетическим потенциалом приводит к нарушению основной функции жировой ткани, заключающейся в накоплении липидов. Полученные нами результаты согласуются с данными A. Diaz-Villaseñor с соавт. [10], которые отмечали снижение экспрессии липогенных генов в висцеральной жировой ткани грызунов с ожирением, и Leah Eissing с соавт. [11], получивших аналогичные результаты при исследовании жировой ткани людей, страдающих ожирением. В то же время в работах J. Berndt с соавт. [12] указывается на повышение уровня *Fasn* в жировой ткани лиц с ожирением. Такие различия в результатах могут объясняться длительностью

Таблица 3. Относительная экспрессия генов *Sirt4* и *Fasn* и содержание белков *Sirt4* и *Fasn* в висцеральной жировой ткани крыс линии Вистар при избыточном потреблении жиров животного происхождения (Ме [25 %; 75 %])

Table 3. Relative expression of the *Sirt4* and *Fasn* genes and the content of the *Sirt4* and *Fasn* proteins in the visceral adipose tissue of Wistar rats on a diet high in animal fats (Me [25 %; 75 %])

Показатель	Группа животных	
	Контроль (<i>n</i> = 20)	Диета (<i>n</i> = 30)
Ген <i>Sirt4</i>	0,0027 [0,0015;0,0034]	0,0014 [0,0011; 0,0021]
Ген <i>Fasn</i>	11,24 [8,83; 21,44]	0,57 [0,45; 0,89]*
Белок <i>Fasn</i> , нг/мл	59,20 [20,40; 82,35]	6,80 [6,40; 8,40]*
Белок <i>Sirt4</i> , нг/мл	13,45 [9,75; 18,85]	4,90 [4,20; 6,30]*

Таблица 4. Корреляционная зависимость между экспрессией генов *Sirt4*, *Fasn* и белками *Sirt4* и *Fasn* в висцеральной жировой ткани крыс линии Вистар и массой тела, массой жировой ткани и показателями липидно-углеводного обмена

Table 4. Correlation between the expression of the *Sirt4*, *Fasn* genes and the *Sirt4* and *Fasn* proteins in the visceral adipose tissue of Wistar rats and the body weight, the adipose tissue mass and the lipid-carbohydrate metabolism indicators

Показатель	Коэффициент корреляции Spearman	<i>p</i>
Ген <i>Sirt4</i> и масса жировой ткани	-0,74	0,036*
Ген <i>Sirt4</i> и масса тела	-0,89	0,002*
Белок <i>Sirt4</i> и масса жировой ткани	-0,64	0,000001*
Белок <i>Sirt4</i> и масса тела	-0,60	0,000006*
Белок <i>Sirt4</i> и глюкоза	-0,60	0,000005*
Белок <i>Sirt4</i> и инсулин	-0,38	0,0067
Белок <i>Sirt4</i> и индекс Нома	-0,66	0,000000
Белок <i>Sirt4</i> и триглицериды	-0,47	0,0028*
Ген <i>Fasn</i> и масса жировой ткани	-0,71	0,000003*
Ген <i>Fasn</i> и масса тела	-0,38	0,026*
Белок <i>Fasn</i> и масса жировой ткани	-0,76	0,000000*
Белок <i>Fasn</i> и масса тела	-0,54	0,00007*
Ген <i>Fasn</i> и глюкоза	-0,71	0,000002*
Белок <i>Fasn</i> и глюкоза	-0,69	0,000000*
Белок <i>Fasn</i> и триглицериды	-0,40	0,012*
Белок <i>Fasn</i> и индекс Нома	-0,60	0,000005*
Ген <i>Fasn</i> и белок <i>Fasn</i>	0,54	0,026*

эксперимента. Возможно, на начальных этапах развития ожирения, экспрессия липогенных генов усиливается, обеспечивая аккумуляцию избыточной энергии в виде жира и предотвращая тем самым развитие сосудисто-метаболических нарушений в организме [13]. При длительном потреблении избыточного количества пищи депонирующая функция жировой ткани нарушается, свободные жирные кислоты попадают в кровеносное русло и впоследствии откладываются эктопически в клетках печени, миокарда, сосудистой стенки и других органов. Кроме того, имеются сведения, что появление именно эктопического жира связано с развитием инсулинорезистентности и метаболических нарушений [14].

Свидетельством возможной негативной роли, которую играет снижение экспрессии изучаемых генов и их белков в висцеральной жировой ткани на обменные процессы в организме, является наличие отрицательной корреляционной зависимости между их уровнями и показателями липидного и углеводного обмена (табл. 4).

Так, снижение уровня белка *Sirt4* в нашем эксперименте ассоциировалось с увеличенным содержанием глюкозы и инсулина в сыворотке крови, а также с развитием инсулинорезистентности, о чем свидетельствовал повышенный индекс Нома. Согласно имеющимся на сегодняшний

день данным, Sirt4 способен влиять на секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы и чувствительность тканей к инсулину [15]. Кроме того, снижение Sirt4 на фоне высокожировой диеты свидетельствует об усилении окисления липидов в митохондриях. Продукты окисления жирных кислот препятствуют контакту инсулина с рецепторами, расположенными на поверхности клеток, что может являться одним из механизмов развития инсулинорезистентности [16].

Известно, что инсулин не только способствует усвоению глюкозы клетками, но и стимулирует липогенез, усиливая экспрессию липогенных генов, в том числе *Fasn*, в гепатоцитах и адипоцитах [17]. Следовательно, уровень *Fasn* зависит от чувствительности тканей к инсулину. В условиях развивающейся при высокожировой диете инсулинорезистентности выявлено снижение содержания *Fasn* в висцеральной жировой ткани крыс. Обнаружена обратная корреляционная зависимость между уровнем белка *Fasn* в жировой ткани и индексом Нома, а также содержанием глюкозы в сыворотке крови (табл. 4), что свидетельствует о подавлении синтеза жирных кислот *de novo* и о снижении адипогенеза в жировой ткани. Следовательно, уменьшение экспрессии гена *Fasn* при высокожировой диете может свидетельствовать о нарушении депонирующей функции жировой ткани, следствием чего может стать повышение содержания триглицеридов в крови. В пользу этого предположения косвенно свидетельствует наличие отрицательной корреляционной связи между содержанием белков *Fasn* и *Sirt4* и уровнем триглицеридов в сыворотке крови (табл. 4). Кроме того, поступающие с пищей жирные кислоты будут меньше откладываться в виде жира, а при попадании в кровь их липотоксическое действие на ткани и органы будет незначительным [18].

Заключение. Таким образом, при длительном избыточном потреблении жиров животного происхождения у самцов крыс линии Вистар обнаружено снижение экспрессии липогенных генов *Sirt4* и *Fasn* и кодируемых ими белков *Sirt4* и *Fasn*, что может свидетельствовать о нарушении депонирующей функции жировой ткани. Помимо компенсаторного подавления синтеза жирных кислот и ослабления липогенеза стимулируется окисление липидов в митохондриях, на что указывает снижение экспрессии гена *Sirt4* и уровня его белка. Это может вносить значимый вклад в формирование инсулинорезистентности и нарушений метаболизма липидов и углеводов в организме. Способность жировой ткани запасать излишки энергии может быть ключевым фактором защиты от метаболических нарушений и патологических состояний, связанных с ожирением. Следовательно, можно предположить, что, оказывая влияние на эту способность жировой ткани путем регулирования экспрессии липогенных генов, в частности *Sirt4* и *Fasn*, эпигенетическими методами можно предотвратить вторичные сосудисто-метаболические осложнения, формирующиеся на фоне ожирения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Хамнуева, Л. Ю. Ожирение. Классификация, этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение : учеб. пособие / Л. Ю. Хамнуева, Л. С. Андреева, И. Н. Кошикова. – Иркутск : Иркут. гос. мед. ун-т, 2007. – 33 с.
2. Полторац, В. В. Сиртуины как перспективная мишень для профилактики и терапии сахарного диабета / В. В. Полторац, Н. С. Красова, М. Ю. Горшунская // Проблемы эндокрин. патології. – 2014. – № 3. – С. 97–104.
3. Min, Zh. The roles of mitochondrial SIRT4 in cellular metabolism / Zh. Min, J. Gao, Y. Yu // Front. Endocrinol. – 2019. – Vol. 9. – Art. 783. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00783>
4. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors / T. M. Loftus [et al.] // Science. – 2000. – Vol. 288, N 5475. – P. 2379–2381. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2379>
5. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice / M. V. Kumar [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99, N 4. – P. 1921–1925. <https://doi.org/10.1073/pnas.042683699>
6. Inverse relation between FASN expression in human adipose tissue and the insulin resistance level / M. D. Mayas [et al.] // Nutr. Metab. – 2010. – Vol. 7, N 1. – P. 1–7. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-3>
7. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation / B. Schmid [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 328, N 4. – P. 1073–1082. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.067>
8. Hariri, N. High-fat diet-induced obesity in animal models / N. Hariri, L. Thibault // Nutr. Res. Rev. – 2010. – Vol. 23, N 2. – P. 270–299. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>
9. Кравчук, Е. Н. Экспериментальные модели метаболического синдрома / Е. Н. Кравчук, М. М. Галагудза // Артер. гипертензия. – 2014. – Т. 20, № 5. – С. 377–383.

10. Diaz-Villaseñor, A. A high fat diet reduces the expression of lipogenic, lipolytic and oxidative genes in white adipose tissue. The effect of the concentration and type of fatty acid is dependent of the dietary protein / A. Diaz-Villaseñor // *FASEB J.* – 2010. – Vol. 24, N S1. – P. 938.11. https://doi.org/10.1096/fasebj.24.1_supplement.938.11
11. *De novo* lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-band metabolic health / L. Eissing [et al.] // *Nat. Commun.* – 2013. – Vol. 4, N 1. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms2537>
12. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes / J. Berndt [et al.] // *Diabetologia.* – 2007. – Vol. 50, N 7. – P. 1472–1480. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0689-x>
13. Moreno-Indias, I. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders / I. Moreno-Indias, F. J. Tinahones // *J. Diabet. Res.* – 2015. – Vol. 2015. – Art. 970375. <https://doi.org/10.1155/2015/970375>
14. Ткачук, В. А. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину / В. А. Ткачук, А. В. Воротников // *Сахар. диабет.* – 2014. – № 2. – С. 29–40.
15. Zaganjor, E. SIRT4 is a regulator of insulin secretion / E. Zaganjor, S. Vyas, M. C. Haigis // *Cell Chem. Biol.* – 2017. – Vol. 24, N 6. – P. 656–658. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.06.002>
16. Lopaschuk, G. D. Fatty acid oxidation and its relation with insulin resistance and associated disorders / G. D. Lopaschuk // *Ann. Nutr. Metab.* – 2016. – Vol. 68, suppl. 3. – P. 15–20. <https://doi.org/10.1159/000448357>
17. Extracellular fatty acid synthase: a possible surrogate biomarker of insulin resistance / J. M. Fernandez-Real [et al.] // *Diabetes.* – 2010. – Vol. 59, N 6. – P. 1506–1511. <https://doi.org/10.2337/db09-1756>
18. Роль липотоксичности в патогенезе сахарного диабета 2 типа и ожирении / Ф. Р. Абдулкадирова [и др.] // *Ожирение и метаболизм.* – 2014. – Т. 11, № 2. – С. 8–12.

References

1. Khamnueva L. Yu., Andreeva L. S., Kosikova I. N. *Obesity. Classification, etiology, pathogenesis, clinical picture, diagnosis, treatment: study guide.* Irkutsk, Irkutsk State Medical University Publ., 2007. 33 p. (in Russian).
2. Poltorak V. V., Krasova N. S., Gorshunskaya M. Yu. Sirtuins as a promising targets for the prevention and therapy of diabetes mellitus. *Problemi endokrynnoi patologii* [Problems of endocrine pathology], 2014, no. 3, pp. 97–104 (in Russian).
3. Min Zh., Gao J., Yu Y. The roles of mitochondrial SIRT4 in cellular metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, vol. 9, art. 783. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00783>
4. Loftus T. M., Jaworsky D. E., Frehywot G. L., Townsend C. A., Ronnett G. V., Lane M. D., Kuhajda F. P. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, 2000, vol. 288, no. 5475, pp. 2379–2381. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2379>
5. Kumar M. V., Shimokawa T., Nagy T. R., Lane M. D. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no. 4, pp. 1921–1925. <https://doi.org/10.1073/pnas.042683699>
6. Mayas M. D., Ortega F. J., Macías-González M., Bernal R., Gómez-Huelgas R., Fernández-Real J. M., Tinahones F. J. Inverse relation between FASN expression in human adipose tissue and the insulin resistance level. *Nutrition and Metabolism*, 2010, vol. 7, no. 1, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-3>
7. Schmid B., Rippmann J. F., Tadayyon M., Hamilton B. S. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, vol. 328, no. 4, pp. 1073–1082. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.067>
8. Hariri N., Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, 2010, vol. 23, no. 2, pp. 270–299. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>
9. Kravchuk E. N., Galagudza M. M. Experimental models of metabolic syndrome. *Arterial'naya gipertenziya* [Arterial hypertension], 2014, vol. 20, no. 5, pp. 377–383 (in Russian).
10. Diaz-Villaseñor A. A high fat diet reduces the expression of lipogenic, lipolytic and oxidative genes in white adipose tissue. The effect of the concentration and type of fatty acid is dependent of the dietary protein. *FASEB Journal*, 2010, vol. 24, p. 938.11. https://doi.org/10.1096/fasebj.24.1_supplement.938.11
11. Eissing L., Scherer T., Tödter K., Knippschild U., Greve J. W., Buurman W. A. [et al.] *De novo* lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-band metabolic health. *Nature Communications*, 2013, vol. 4, no. 1, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms2537>
12. Berndt J., Kovacs P., Ruschke K., Klötting N., Fasshauer M., Schön M. R., Körner A., Stumvoll M., Blüher M. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2007, vol. 50, no. 7, pp. 1472–1480. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0689-x>
13. Moreno-Indias I., Tinahones F. J. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *Journal of Diabetes Research*, 2015, vol. 2015, art. 970375. <https://doi.org/10.1155/2015/970375>
14. Ткачук В. А., Воротников А. В. Молекулярные механизмы развития инсулинорезистентности / В. А. Ткачук, А. В. Воротников // *Сахар. диабет.* – 2014. – № 2. – С. 29–40 (in Russian).
15. Zaganjor E., Vyas S., Haigis M. C. SIRT4 is a regulator of insulin secretion. *Cell Chemical Biology*, 2017, vol. 24, no. 6, pp. 656–658. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.06.002>
16. Lopaschuk G. D. Fatty acid oxidation and its relation with insulin resistance and associated disorders. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2016, vol. 68, suppl. 3, pp. 15–20. <https://doi.org/10.1159/000448357>

17. Fernandez-Real J. M., Menendez J. A., Moreno-Navarrete J. M., Blüher M., Vazquez-Martin A., Vázquez M., Ortega J. F., Díeguez C., Frühbeck G., Ricart W., Vidal-Puig A. Extracellular fatty acid synthase: a possible surrogate biomarker of insulin resistance. *Diabetes*, 2010, vol. 59, no. 6, pp. 1506–1511. <https://doi.org/10.2337/db09-1756>

18. Abdulkadirova F. R., Ametov A. S., Doskina E. V., Pokrovskaya R. A. The role of lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and obesity. *Ozhireniye i metabolism* [Obesity and metabolism], 2014, vol. 11, no. 2, pp. 8–12 (in Russian).

Информация об авторах

Полулях Ольга Евгеньевна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: reanzy@yandex.ru

Калиновская Елена Игоревна – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zolotuhinaelena@mail.ru

Басалай Анастасия Александровна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com

Мигалевич Анастасия Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mihalevich.a.s@mail.ru

Information about the authors

Olga Y. Poluliakh – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: reanzy@yandex.ru

Elena I. Kalinovskaya – Ph. D. (Med.), Leading Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zolotuhinaelena@mail.ru

Anastasiya A. Basalai – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com

Anastasiya S. Mihalevich – Junior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mihalevich.a.s@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 612.428+616.411-006.441]-073.756.8

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-70-83>

Поступила в редакцию 02.06.2021

Received 02.06.2021

С. А. Хоружик, А. В. Карман, Э. А. Жаврид

*Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь*

МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНО-ТОМОГРАФИЧЕСКИЙ ИЗМЕРЯЕМЫЙ КОЭФФИЦИЕНТ ДИФфуЗИИ ПРИ ЛИМФОМАХ И ЕГО ЗАВИСИМОСТЬ ОТ РЯДА ТЕХНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Аннотация. Цель исследования – определить значение измеряемого коэффициента диффузии (ИКД) при различных морфологических вариантах лимфом и изучить его зависимость от анатомической локализации поражений и технических параметров сканирования для установления полезности ИКД при дифференциации нормальных и пораженных лимфатических узлов (ЛУ).

Магнитно-резонансная томография с диффузионно-взвешенным исследованием (ДВИ) всего тела была выполнена 209 пациентам с лимфомой до начала лечения. Для определения значения ИКД у каждого пациента выбирали целевой ЛУ.

Установлено, что ИКД не зависит от использования методики параллельной визуализации ($p = 0,56$). Его значение при использовании встроенной катушки выше, чем при использовании поверхностной ($p < 0,0001$), а при применении респираторного триггеринга выше, чем при свободном дыхании ($p < 0,02$). Наиболее высокое значение ИКД ($\times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$) получено в пораженных ЛУ корней легких ($1,429 \pm 0,396$) и средостения ($1,338 \pm 0,313$), более низкое ($p < 0,01$) – в ЛУ брюшной полости ($1,011 \pm 0,298$), подмышечных ($0,840 \pm 0,196$), шеи ($0,834 \pm 0,259$), паховых ($0,753 \pm 0,128$), подвздошных ($0,738 \pm 0,129$). В зависимости от морфологического варианта лимфомы наиболее высокое значение ИКД получено при лимфоме Ходжкина – $1,168 \pm 0,372$ ($p < 0,0002$). При диффузной В-крупноклеточной неходжкинской лимфоме ИКД составил $0,951 \pm 0,320$, при индолентных неходжкинских лимфомах – $0,756 \pm 0,246$, при неходжкинской лимфоме из клеток мантийной зоны – $0,759 \pm 0,211$.

ДВИ-сканирование при лимфоме целесообразно проводить с использованием поверхностной катушки, методики параллельной визуализации и при свободном дыхании. Установлены статистически значимые отличия ИКД в зависимости от анатомической локализации поражений и морфологического варианта лимфомы. Учитывая зависимость ИКД от различных технических и клинических факторов, установить единое пороговое значение для дифференциации пораженных и нормальных ЛУ не представляется возможным. Использование для этой цели такого критерия, как размер ЛУ, является при лимфоме наиболее оптимальным.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, магнитно-резонансная томография, диффузионно-взвешенное исследование, измеряемый коэффициент диффузии, лимфатические узлы

Для цитирования: Хоружик, С. А. Магнитно-резонансно-томографический измеряемый коэффициент диффузии при лимфомах и его зависимость от ряда технических и клинических факторов / С. А. Хоружик, А. В. Карман, Э. А. Жаврид // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 70–83. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-70-83>

Siarhei A. Kharuzhyk, Andrey V. Karman, Edward A. Zhavrid

N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MAGNETIC RESONANCE IMAGING APPARENT DIFFUSION COEFFICIENT IN LYMPHOMAS AND ITS DEPENDENCE ON A NUMBER OF TECHNICAL AND CLINICAL FACTORS

Abstract. The purpose of this study was to determine the value of apparent diffusion coefficient (ADC) in various morphological variants of lymphomas, to study dependence of ADC on the anatomical location of lesions and technical scanning parameters to establish the usefulness in differentiating normal and involved lymph nodes (LN).

Whole body MRI with diffusion-weighted imaging (DWI) was performed in 209 patients with lymphoma before treatment. A target LN was selected and ADC determined in each patient.

The ADC value does not depend on the use of the parallel imaging technique ($p = 0.56$), higher when using built-in compared to superficial coil ($p < 0.0001$), higher when using respiratory triggering than free breathing ($p < 0.02$). The highest ADC values ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) were obtained in the involved LN of the lung hilar (1.429 ± 0.396) and mediastinum (1.338 ± 0.313), lower

values ($p < 0.01$) – in the LN of the abdomen (1.011 ± 0.298), axillary (0.840 ± 0.196), neck (0.834 ± 0.259), inguinal (0.753 ± 0.128) and iliac (0.738 ± 0.129). Depending on the morphological variant of lymphoma, the highest ADC value was obtained in Hodgkin lymphoma – 1.168 ± 0.372 ($p < 0.0002$). ADC in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma was 0.951 ± 0.320 , indolent non-Hodgkin lymphomas – 0.756 ± 0.246 , mantle zone non-Hodgkin lymphoma – 0.759 ± 0.211 .

In conclusion, DWI in lymphoma should be performed using surface coil, parallel imaging, and free breathing. Statistically significant differences in ADC were found depending on the anatomical location of the lesions and the morphological variant of lymphoma. Given the dependence of ADC on various technical and clinical factors, it is not possible to establish a single threshold value for differentiating involved and normal LN. The use of the LN size criterion for this purpose is the most optimal in lymphoma.

Keywords: Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, magnetic resonance imaging, diffusion-weighted imaging, apparent diffusion coefficient, lymph nodes

For citation: Kharuzhyk S. A., Karman A. V., Zhavrid E. A. Magnetic resonance imaging apparent diffusion coefficient in lymphomas and its dependence on a number of technical and clinical factors. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 70–83 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-70-83>

Введение. Магнитно-резонансная томография с диффузионно-взвешенным исследованием (МРТ-ДВИ) всего тела – безопасный и эффективный метод лучевой диагностики, который находит применение в различных областях медицины – от ревматологии до онкологии. В 2004 г. МРТ-ДВИ всего тела пациенту с лимфомой впервые выполнил Т. Takahara [1]. С того времени метод претерпел значительные технические усовершенствования, что позволяет провести сканирование всего тела менее чем за час. Основными преимуществами МРТ-ДВИ перед другими методами медицинской визуализации являются высокая контрастная разрешающая способность, отсутствие ионизирующего излучения, необходимости внутривенного введения контрастных веществ и радиоактивных изотопов. Не требуется специальной подготовки пациента, кроме обычных мер безопасности при выполнении любого МРТ-исследования. Преимуществом ДВИ перед другими импульсными последовательностями является количественная оценка с помощью измеряемого коэффициента диффузии (ИКД).

При лимфомах МРТ-ДВИ всего тела используют для стадирования, прогнозирования и оценки эффективности лечения [2–6]. Значение ИКД поражений при лимфоме ниже, чем в нормальных лимфоузлах (ЛУ) [7], при доброкачественной лимфаденопатии [8], саркоидозе [9, 10], плоскоклеточном раке [11]. Низкие значения ИКД при лимфомах объясняют более высокой клеточностью, чем в нормальных тканях, доброкачественных и многих злокачественных опухолях. Вместе с тем лимфомы являются неоднородной группой злокачественных опухолей, включающей лимфому Ходжкина (ЛХ) и неходжкинские лимфомы (НХЛ), а среди НХЛ выделяют более 40 морфологических вариантов, которые разделяют на агрессивные и индолентные. К наиболее частым агрессивным НХЛ относят диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), фолликулярную G3, некоторые Т-клеточные, к индолентным – фолликулярную G1-2, мелкоклеточную лимфоцитарную, маргинальной зоны, лимфоплазмочитарную, грибовидный микоз. Лимфому из клеток мантийной зоны относят к агрессивным НХЛ, но у части пациентов она имеет индолентное течение.

В литературе имеются немногочисленные публикации, в которых на сравнительно небольших группах пациентов были определены значения ИКД при различных морфологических вариантах лимфом. Некоторые авторы указывают на отсутствие отличий между значениями ИКД при ЛХ и НХЛ [9], агрессивных и индолентных НХЛ [7], другими авторами получены противоположные результаты [12]. Эти расхождения могут быть связаны с влиянием на значения ИКД ряда клинических и технических факторов, что изучено недостаточно [13–15].

Во многих работах исследована диагностическая эффективность МРТ-ДВИ всего тела по сравнению с позитронной эмиссионной томографией, комбинированной с компьютерной томографией (ПЭТ/КТ) [3, 6, 14]. При интерпретации ПЭТ/КТ для дифференциации нормальных тканей и опухолевых очагов используют количественный показатель уровня метаболизма глюкозы – стандартизованный показатель накопления. В этой связи актуальным является вопрос, может ли ИКД быть использован для этой же цели у пациентов с лимфомой. Однако для того, чтобы решить этот вопрос, желательно найти единое пороговое значение ИКД.

Цель данного исследования – определить значение измеряемого коэффициента диффузии при различных морфологических вариантах лимфом и изучить его зависимость от анатомической локализации поражений и технических параметров сканирования для установления полезности данного коэффициента при дифференциации нормальных и пораженных лимфоузлов.

Материалы и методы исследования. В проспективное исследование были включены пациенты с морфологически верифицированной лимфомой, которые проходили обследование и лечение в Республиканском научно-практическом центре онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова в 2013–2019 гг. Всем пациентам до начала лечения было выполнено МРТ-ДВИ всего тела. Сканирование проводили на томографе Optima 450w («Дженерал Электрик», США) с напряженностью магнитного поля 1,5 Тл, используя встроенную катушку для тела (катушку BODY). Уровень сканирования – от основания черепа до средней трети бедер. Методика сканирования описана в наших предыдущих публикациях [2, 3, 6]. После анализа изображений всего тела рентгенологом у каждого пациента было выбрано целевое поражение, на уровне которого проведено дополнительное ДВИ-сканирование с использованием 8-канальной поверхностной катушки для тела (катушка 8Ch) в трансверсальной плоскости, с факторами диффузии b 0 и 800 с/мм^2 , толщиной среза 5 мм. В качестве целевого выбирали ЛУ размером более 1 см по короткой оси, не являющийся кистозным или некротическим. Старались выбрать ЛУ наибольшего размера, с визуально наименьшей интенсивностью сигнала на карте ИКД. Поражение должно уменьшиться после химиотерапии, что подтверждало вовлечение лимфомой. У некоторых пациентов был выбран дополнительный пораженный ЛУ, отвечающий вышеуказанным критериям, но находящийся в другой анатомической области. У этих пациентов определяли разницу между значениями ИКД поражений, находящихся в разных анатомических зонах.

Для определения ИКД наносили контур целевого поражения на изображении ДВИ b 800 с/мм^2 , стараясь включить всю площадь поражения на срезе (за исключением границ и участков некроза) и избегая артефактов. При необходимости, чтобы устранить влияние двигательных артефактов, контур корректировали на изображении ДВИ b 0 с/мм^2 , после чего автоматически переносили на карту ИКД. Записывали среднее значение ИКД в выделенной зоне интереса. Если позволял размер поражения, данную процедуру повторяли на трех срезах и вычисляли среднее значение ИКД целевого поражения.

С целью определения влияния на значения ИКД технических параметров сканирования проведено сравнение ИКД целевых ЛУ при ДВИ-сканировании в ту же сессию (не снимая пациента со стола) 2 раза:

- с использованием катушек 8Ch и BODY, при свободном дыхании;
- с помощью катушки 8Ch без использования и с использованием методики параллельной визуализации ASSET (Array coil Spatial Sensitivity Encoding), при свободном дыхании;
- с помощью катушки 8Ch подвижных при дыхании ЛУ (средостения и корней легких) при использовании респираторного триггеринга и при свободном дыхании.

С целью определения влияния на значения ИКД клинических факторов сравнивали ИКД целевых ЛУ, полученные при ДВИ-сканировании с использованием катушки 8Ch при свободном дыхании, в следующих подгруппах пациентов:

- пациенты с целевыми ЛУ, расположенными в различных анатомических зонах: шея, подмышечные ЛУ, средостение, корни легких, брюшная полость, подвздошные, паховые;
- пациенты с ЛХ, НХЛ и морфологическими вариантами НХЛ: агрессивные, ДВКЛ, индолентные, из клеток мантийной зоны.

ИКД зависит от клеточности лимфомы [16, 17]. В этой связи с целью объяснения отличий между значениями ИКД при различных морфологических вариантах лимфом и различной локализации поражений проводили сравнение клеточности в гистологическом материале. Для этого была сформирована подгруппа пациентов, у которых была выполнена эксцизионная биопсия, а целевой ЛУ находился в той же анатомической зоне. В качестве показателя клеточности использовали количество ядер в поле зрения в микропрепарате. Методика подсчета ядер изложена в нашей предыдущей публикации [16].

Для проверки нормальности распределения значений ИКД использовали тест Колмогорова–Смирнова. Для сравнения значений ИКД в независимых группах применяли критерий Манна–Уитни, при повторных измерениях – критерий Уилкоксона. Значения ИКД представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Для статистической обработки данных использовали пакет программ Microsoft Excel 2007, SPSS 20.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. В исследование были включены 209 пациентов с лимфомой. ЛХ имела место у 111 человек, НХЛ – у 98, в том числе агрессивная НХЛ – у 55 (ДВКЛ – у 53, Т-клеточная – у 2), индолентная НХЛ – у 18 (мелкоклеточная лимфоцитарная – у 7, из клеток маргинальной зоны – у 6, фолликулярная G1-2 – у 5), НХЛ из клеток мантийной зоны – у 25. Целевые ЛУ локализовались в следующих анатомических зонах: шея – 35 пациентов, грудная клетка – 101 (подмышечный – 27, средостения – 58, корня легкого – 16), брюшная полость – 29, таз – 44 (подвздошный – 22, паховый – 22). Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с лимфомой ($n = 209$)Table 1. Clinical characteristics in patients with lymphoma ($n = 209$)

Параметр	Вид лимфомы	
	ЛХ ($n = 111$)	НХЛ ($n = 98$)
М/Ж, n	51/60	51/47
Средний возраст (интервал), лет	33 ± 11 (19–71)	53 ± 14 (26–77)
Морфологический вариант, n	Нодулярный склероз – 76, смешанно-клеточная – 23, лимфоидное преобладание – 4, нодулярный тип лимфоидного преобладания – 3, не установлен – 3, классическая (вариант не уточнен) – 1, лимфоидное истощение – 1	ДВКЛ – 53, из клеток мантийной зоны – 25, мелкоклеточная лимфоцитарная – 7, из клеток маргинальной зоны – 6, фолликулярная G1-2 – 5, Т-клеточная анапластическая крупноклеточная – 1, периферическая Т-клеточная неспецифическая – 1
Стадия Ann Arbor, n	I – 5, II – 50, III – 19, IV – 37	I – 1, II – 27, III – 11, IV – 59
Локализация целевого ЛУ, n	Шея – 18, подмышечный – 16, средостение – 47, корень легкого – 11, брюшная полость – 6, подвздошный – 8, паховый – 5	Шея – 17, подмышечный – 11, средостение – 11, корень легкого – 5, брюшная полость – 23, подвздошный – 14, паховый – 17

Значения ИКД в зависимости от технических параметров ДВИ-сканирования. Значения ИКД целевых ЛУ, полученные при ДВИ-сканировании в ту же сессию 2 раза (с использованием встроенной (BODY) и поверхностной (8Ch) катушек, при свободном дыхании) сравнили у 61 случайно выбранного пациента. Значения ИКД ($\times 10^{-3}$ мм²/с) при использовании встроенной катушки статистически значимо выше, чем при использовании поверхностной – $1,113 \pm 0,434$ и $1,008 \pm 0,362$ соответственно ($p < 0,0001$). ДВИ-изображения и карты ИКД, полученные при использовании катушки 8Ch, визуально характеризовались более высоким соотношением сигнал/шум.

Сравнение значений ИКД целевых ЛУ, полученных при ДВИ-сканировании с помощью катушки 8Ch в ту же сессию 2 раза (без использования и с использованием методики параллельной визуализации ASSET, при свободном дыхании) у 31 случайно выбранного пациента, показало отсутствие статистически значимых отличий – $1,139 \pm 0,446$ и $1,131 \pm 0,465$ соответственно ($p = 0,56$). При использовании ASSET улучшалось качество ДВИ-изображений и карт ИКД за счет уменьшения деформационных артефактов.

При определении значений ИКД подвижных при дыхании целевых ЛУ (средостения и корней легких), полученных при ДВИ-сканировании с помощью катушки 8Ch в ту же сессию 2 раза (при использовании респираторного триггеринга и при свободном дыхании), сравнили у 43 случайно выбранных пациентов. Установлено, что значения ИКД при использовании респираторного триггеринга статистически значимо выше, чем при свободном дыхании, – $1,424 \pm 0,415$ и $1,342 \pm 0,337$ соответственно ($p < 0,02$).

Таким образом, значения ИКД пораженных ЛУ не зависят от использования методики параллельной визуализации, повышаются при использовании встроенной катушки и респираторного триггеринга.

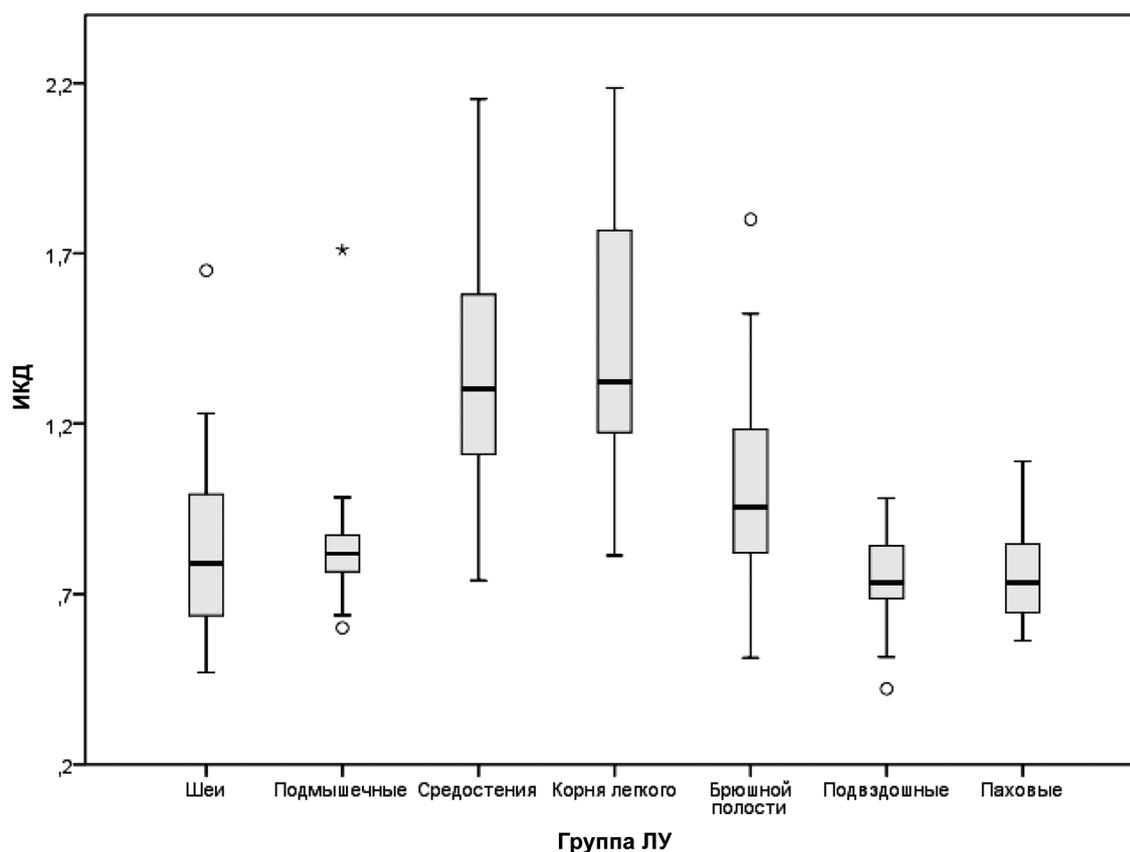
Таблица 2. Значения ИКД ($\times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$) в зависимости от анатомической локализации пораженных ЛУ у пациентов с лимфомой ($n = 209$)Table 2. ADC values ($\times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$) depending on the anatomical location of the involved LNs in patients with lymphoma ($n = 209$)

Значение ИКД	Группа ЛУ						
	шеи ($n = 35$)	подмышечные ($n = 27$)	средостения ($n = 58$)	корней легких ($n = 16$)	брюшной полости ($n = 29$)	подвздошные ($n = 22$)	паховые ($n = 22$)
Среднее	0,834	0,840	1,338	1,429	1,011	0,738	0,753
Стандартное отклонение	0,259	0,196	0,313	0,396	0,298	0,129	0,128
Медиана	0,790	0,819	1,301	1,322	0,955	0,733	0,734
Минимальное	0,470	0,601	0,740	0,814	0,513	0,422	0,564
Максимальное	1,650	1,710	2,153	2,186	1,800	0,982	1,090

Значения ИКД в зависимости от анатомической локализации поражений. Значения ИКД целевых ЛУ в зависимости от анатомической локализации представлены в табл. 2 и на рис. 1.

Наиболее высокие значения ИКД получены в пораженных ЛУ корней легких и средостения. Между собой они не отличаются ($p = 0,37$), но выше, чем в остальных анатомических группах ($p < 0,01$). ИКД пораженных ЛУ брюшной полости также выше, чем в остальных группах ($p < 0,004$), кроме средостения и корней легких. ИКД подмышечных ЛУ выше подвздошных ($p < 0,035$) и паховых ($p < 0,03$) ЛУ. Между ИКД ЛУ шеи и подмышечных, а также шеи, подвздошных и паховых различий не выявлено ($p > 0,3$).

ДВИ-сканирование дополнительного пораженного ЛУ, находящегося в другой анатомической зоне, чем целевой ЛУ, с использованием катушки 8Ch при свободном дыхании проведено

Рис. 1. Ящичные диаграммы значений ИКД ($\times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$) в зависимости от анатомической локализации пораженных ЛУ у пациентов с лимфомой ($n = 209$)Fig. 1. Box plots of ADC values ($\times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$) depending on the anatomical location of the involved LNs in patients with lymphoma ($n = 209$)

у 49 пацянтав. Сярэняя разніца значэнняў ІКД ($\times 10^{-3}$ мм²/с) цэлевага і дапаўняльнага паражаных ЛУ у аднаго і таго ж пацянта складала:

пры лакалізацыі аднаго ЛУ в сярэдасценні, другога – в корне легкаго (8 пацянтав) – $0,360 \pm 0,276$;

пры лакалізацыі аднаго з ЛУ в сярэдасценні ілі корне легкаго (16 пацянтав: сярэдасценне і шея – 12, корне легкаго і шея – 2, сярэдасценне і бр’юшная поласць, корне легкаго і подмышечный – по 1) – $0,382 \pm 0,292$;

пры лакалізацыі абодвух ЛУ не в сярэдасценні і не в корне легкаго (25 пацянтав: подвздошный і паховый – 20 пацянтав, подмышечный і шея – 4, бр’юшной полости і шея – 1) – $0,069 \pm 0,051$.

Такім образом, ІКД паражаных ЛУ сярэдасцення і караней легких вышэ, чэм в остальных анатомічэскіх групках, как пры сраваненні между пацянтамі, так і пры сраваненні разных груп ЛУ у аднаго пацянта. Отліччэ значэнняў ІКД между групамі ЛУ вне сярэдасцення і караней легких у таго ж пацянта значітэльно меншэ.

Значення ІКД в зависимости от морфологического варианта лимфомы. Значення ІКД цэлевых ЛУ в зависимости от морфологического варианта лимфомы прадставлены в табл. 3 і на рис. 2.

Таблица 3. Значения ІКД ($\times 10^{-3}$ мм²/с) паражаных ЛУ в зависимости от морфологического варианта лимфомы у пацянтав ($n = 209$)

Table 3. ADC values ($\times 10^{-3}$ мм²/s) of the involved LNs depending on the morphological variant of lymphoma in patients ($n = 209$)

Значение ІКД	Морфологический вариант лимфомы						
	Все лимфомы ($n = 209$)	ЛХ ($n = 111$)	НХЛ ($n = 98$)	Агрессивные НХЛ ($n = 55$)	ДВКЛ ($n = 53$)	Индолентные НХЛ ($n = 18$)	НХЛ из клеток мантійной зоны ($n = 25$)
Среднее	1,026	1,168	0,864	0,948	0,951	0,756	0,759
Стандартное отклонение	0,369	0,372	0,293	0,315	0,320	0,246	0,211
Медиана	0,911	1,095	0,785	0,859	0,855	0,724	0,709
Минимальное	0,422	0,601	0,422	0,470	0,470	0,422	0,515
Максимальное	2,186	2,186	1,781	1,781	1,781	1,327	1,470

При ЛХ значение ІКД паражаных ЛУ вышэ, чэм пры всех других морфологических вариантах лимфом ($p < 0,0002$). ІКД пры агрессивных НХЛ і ДВКЛ вышэ, чэм пры индолентных і из клеток мантійной зоны НХЛ ($p < 0,02$). Пры индолентных і из клеток мантійной зоны НХЛ отліччій между ІКД не выявлено ($p = 0,67$).

Как следует из табл. 1, у пацянтав с ЛХ цэлевые ЛУ лакалізавались в сярэдасценні і корнях легких в 52 % случаев, в то время как пры НХЛ – только в 16 %. Согласно литературным данным, сердечно-сосудистая пульсация может приводить к артефактному завышению ІКД внутрigrудных ЛУ [14, 18]. В этой связи производили пересчет значэнняў ІКД пры различных морфологических вариантах лимфом, исключив ЛУ сярэдасцення і караней легких. Полученные значения ІКД у 135 пацянтав с цэловыми ЛУ вне сярэдасцення і караней легких (шея, подмышечные, бр’юшной полости, подвздошные, паховые) прадставлены в табл. 4 і на рис. 3.

После исключения ЛУ сярэдасцення і караней легких ІКД пры ЛХ по-прежнему был вышэ, чэм пры всех других морфологических вариантах лимфом ($p < 0,003$); ІКД пры агрессивных НХЛ і ДВКЛ был статистически незначимо вышэ, чэм пры индолентных і из клеток мантійной зоны НХЛ ($p = 0,17-0,29$); ІКД пры индолентных і из клеток мантійной зоны не отлічались ($p = 0,67$).

Связь значэнняў ІКД и клеточности лимфом. Выполнена эксцизионная биопсия ЛУ той же анатомічэскіх зоны, в которой находится цэлевой ЛУ, у 77 пацянтав (ЛХ – у 39, НХЛ – у 38) і определен показатель клеточности лимфомы в их гистологическом материале. Учитывая, что у пацянтав с НХЛ цэлевые ЛУ лакалізавались в сярэдасценні ілі корнях легких только в 9 (24 %) из 38 случаев (пры ЛХ – в 15 (38 %) из 39 случаев) і что НХЛ являются гетерогенной с морфологической точки зрения группой лимфом, ЛУ сярэдасцення і караней легких пры НХЛ не анализировали. Так как, по полученным данным, значения ІКД пры индолентных і мантійной

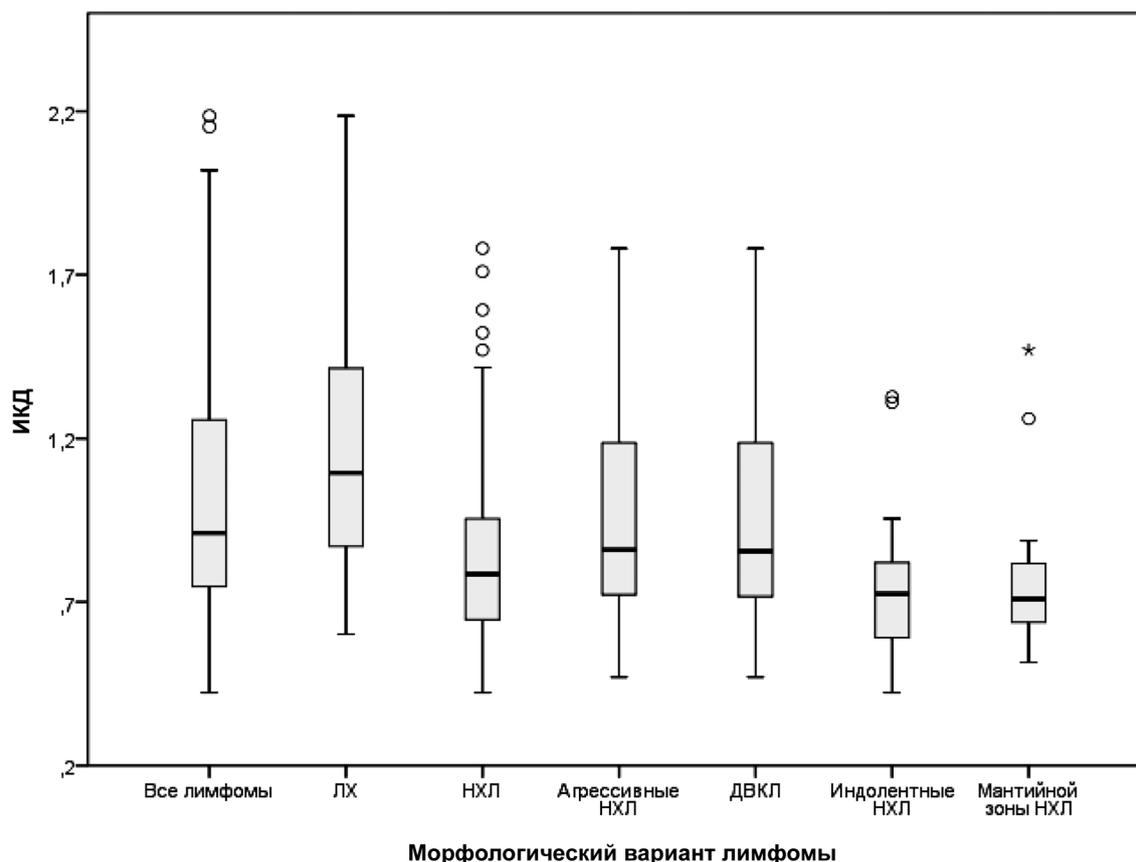


Рис. 2. Ящичные диаграммы значений ИКД ($\times 10^{-3}$ мм²/с) пораженных ЛУ в зависимости от морфологического варианта лимфомы у пациентов ($n = 209$)

Fig. 2. Box plots of the ADC values ($\times 10^{-3}$ mm²/s) of the involved LNs depending on the morphological variant of lymphoma in patients ($n = 209$)

Таблица 4. Значения ИКД ($\times 10^{-3}$ мм²/с) пораженных ЛУ, кроме ЛУ средостения и корней легких, в зависимости от морфологического варианта лимфомы у пациентов ($n = 135$)

Table 4. ADC values ($\times 10^{-3}$ mm²/s) of the involved LNs, except for the LN of the mediastinum and lung hilars depending on the morphological variant of lymphoma in patients ($n = 135$)

Значение ИКД	Морфологический вариант лимфомы						
	Все лимфомы ($n = 135$)	ЛХ ($n = 53$)	НХЛ ($n = 82$)	Агрессивные НХЛ ($n = 39$)	ДВКЛ ($n = 37$)	Индолентные НХЛ ($n = 18$)	НХЛ из клеток мантийной зоны ($n = 25$)
Среднее	0,844	0,927	0,791	0,827	0,825	0,756	0,759
Стандартное отклонение	0,240	0,215	0,241	0,256	0,263	0,246	0,211
Медиана	0,815	0,882	0,738	0,758	0,741	0,724	0,709
Минимальное	0,422	0,601	0,422	0,470	0,470	0,422	0,515
Максимальное	1,800	1,800	1,710	1,710	1,710	1,327	1,470

зоны НХЛ не отличаются, их объединили в одну группу. Результаты сравнения ИКД и клеточности представлены в табл. 5.

Как следует из табл. 5, более высокому значению ИКД пораженных ЛУ средостения и корней легких соответствует их более низкая клеточность в гистологическом материале по сравнению с таковой при поражении ЛУ других анатомических зон ($p < 0,021$), а более высокому значению ИКД пораженных ЛУ вне средостения и корней легких при ЛХ и ДВКЛ – более низкая клеточность, чем в индолентных и мантийной зоне НХЛ ($p < 0,0001$). Следовательно, установленные отличия ИКД могут быть объяснены отличием клеточности.

Обсуждение. ИКД характеризует диффузию молекул воды и рассматривается в качестве биомаркера нормальных и патологических процессов в организме на клеточном уровне. Величина

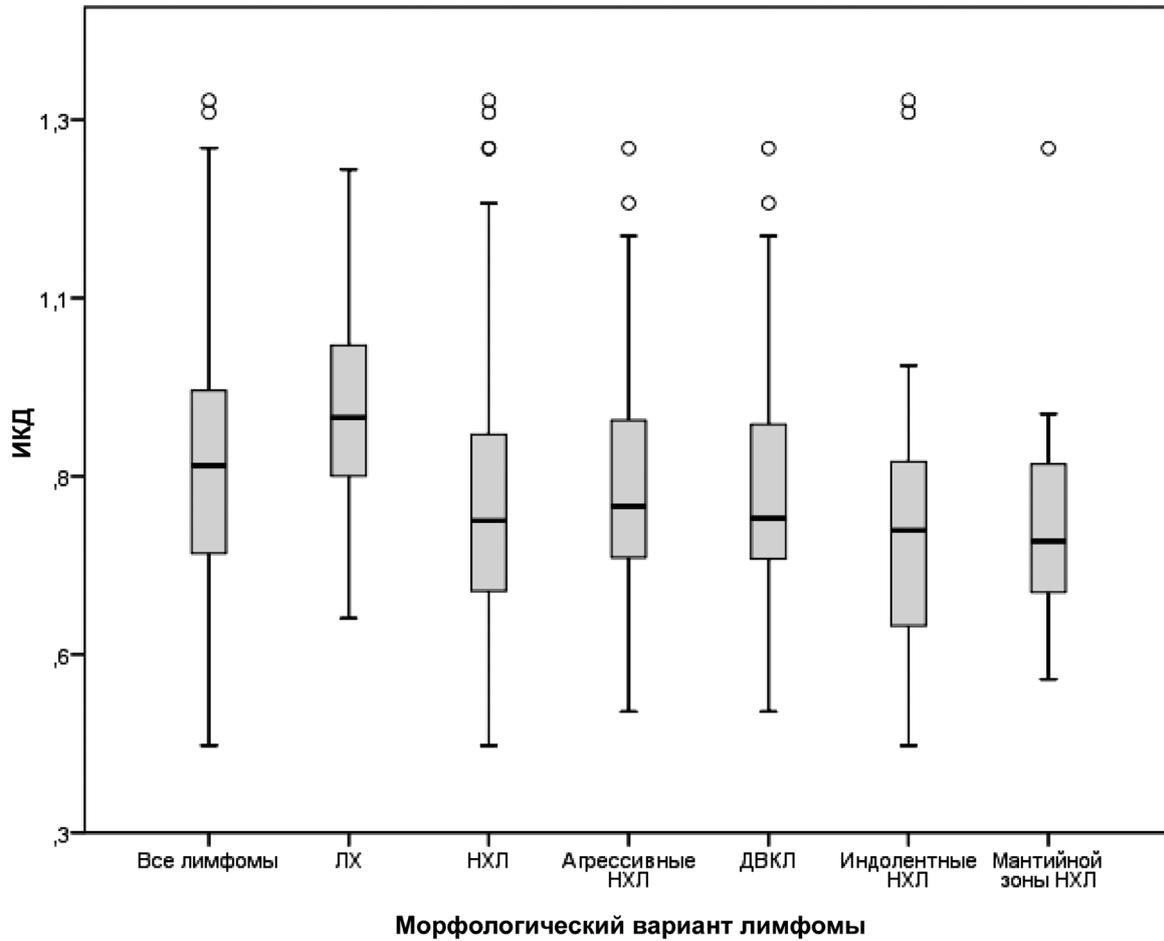


Рис. 3. Ящичные диаграммы значений ИКД ($\times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$) пораженных ЛУ, кроме ЛУ средостения и корней легких, в зависимости от морфологического варианта лимфомы у пациентов ($n = 135$)

Fig. 3. Box plots of the ADC values ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) of the involved LNs, except for the LN of the mediastinum and lung hilar depending on the morphological variant of lymphoma in patients ($n = 135$)

Таблица 5. Сравнение ИКД ($\times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$) и клеточности пораженных ЛУ в зависимости от анатомической локализации и морфологического варианта лимфомы

Table 5. Comparison of ADC ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) and cellularity of the involved LNs depending on the anatomical location and morphological variant of lymphoma

Пациенты			Сравнение ИКД		Сравнение клеточности	
Вид лимфомы	Группа ЛУ	К-во	ИКД	<i>p</i>	Клеточность	<i>p</i>
ЛХ	Средостения и корней легких	15	$1,310 \pm 0,350$	< 0,0004	2241 ± 796	< 0,021
	Кроме средостения и корней легких	24	$0,946 \pm 0,227$		2822 ± 663	
ЛХ	Кроме средостения и корней легких	24	$0,946 \pm 0,227$	0,0000	2822 ± 663	>0,2
НХЛ		29	$0,749 \pm 0,164$		3061 ± 736	
ЛХ	Кроме средостения и корней легких	24	$0,946 \pm 0,227$	< 0,0001	2822 ± 663	>0,15
ДВКЛ		14	$0,817 \pm 0,193$		2521 ± 474	
ЛХ	Кроме средостения и корней легких	24	$0,946 \pm 0,227$	0,0000	2822 ± 663	< 0,0001
Индолентные и мантийной зоны НХЛ		13	$0,656 \pm 0,069$		3703 ± 431	
ДВКЛ	Кроме средостения и корней легких	14	$0,817 \pm 0,193$	< 0,007	2521 ± 474	0,0000
Индолентные и мантийной зоны НХЛ		13	$0,656 \pm 0,069$		3703 ± 431	

ИКД зависит от тканевой структуры, в частности от размера и плотности расположения клеток, поскольку диффузия происходит в основном в межклеточных пространствах. Ранее нами показана высокая внутри- и межоператорская воспроизводимость ИКД при лимфоме [19]. Однако влияние оператора – это лишь один из возможных источников вариабельности ИКД. Международная группа исследователей выделила следующие группы факторов, оказывающих влияние на значения ИКД: 1) биологические (пациент: размер, форма, степень сотрудничества; поражение: расположение, неоднородность, фенотип, посттерапевтические изменения); 2) оператор сканера (построение протокола сканирования, укладка пациента, уровень квалификации); 3) МРТ-сканер (аппаратная/программная платформа, импульсная последовательность ДВИ и ее технические параметры, характеристики сканера); 4) алгоритм построения карт ИКД; 5) врач (способ нанесения контура для измерения ИКД) [20]. В данной работе исследована зависимость ИКД от ряда технических параметров ДВИ-сканирования и клинических факторов.

Методика параллельной визуализации улучшает временное, пространственное разрешение, уменьшает артефакты (в частности, геометрические искажения), что особенно важно для эхо-планарных импульсных последовательностей, к которым относится ДВИ, но при этом снижается соотношение сигнал/шум [21]. В нашем исследовании использование методики параллельной визуализации ASSET не оказало влияния на значение ИКД пораженных ЛУ при лимфоме по сравнению со сканированием без ASSET ($p = 0,56$). Аналогично, в исследовании G. Jin с соавт. [22] использование ASSET не повлияло на значение ИКД нормальных и опухолевых тканей молочной железы.

Параллельная визуализация возможна только при использовании многоканальной катушки и невозможна при использовании встроенной. В многоканальной катушке каждый канал усиливает не только сигнал, но и шум, увеличивая их пропорционально количеству каналов (в нашем случае их 8). Учитывая, что на ДВИ-изображениях с высоким фактором диффузии b соотношение сигнал/шум ниже, чем на ДВИ-изображениях с низким b , шум на ДВИ-изображениях с высоким b возрастает в большей степени и, добавляясь к сигналу, снижает ИКД. Этим можно объяснить полученные в нашем исследовании более низкие значения ИКД пораженных ЛУ при использовании поверхностной катушки, чем при использовании встроенной ($p < 0,0001$).

По полученным данным, ИКД пораженных ЛУ средостения и корней легких (подвержены влиянию дыхания) при использовании респираторного триггеринга выше, чем при свободном дыхании ($p < 0,02$). Других публикаций, в которых было бы изучено влияние способа контроля дыхания на ИКД ЛУ грудной полости при лимфомах, нами не найдено. В работе С. Mesmann с соавт. у пациентов с медиастинальной лимфаденопатией на ДВИ-изображениях оценены качество подавления сигнала от жировой ткани, двигательные артефакты, соотношение сигнал/фон при сканировании с использованием респираторного триггеринга и свободном дыхании. По всем показателям статистически значимых отличий не получено. При этом длительность сканирования ДВИ с респираторным триггерингом в среднем в 2,8 раза больше, чем при свободном дыхании. Авторы делают вывод, что респираторный триггеринг не улучшает качество ДВИ-изображений при медиастинальной лимфаденопатии [23]. Таким образом, использование респираторного триггеринга при ДВИ грудной клетки приводит к увеличению ИКД пораженных ЛУ и длительности сканирования, при этом качество изображений не улучшается. Поэтому при МРТ-ДВИ всего тела у пациентов с лимфомой ДВИ грудной клетки целесообразно сканировать таким же способом, как остальные отделы тела, – при свободном дыхании.

Во второй части нашего исследования изучена зависимость ИКД от клинических факторов – анатомической локализации пораженных ЛУ и морфологического варианта лимфомы. Влияние обоих факторов на ИКД при лимфоме изучено в литературе недостаточно. Важным результатом исследования является доказательство того, что пораженные ЛУ средостения и корней легких при лимфоме имеют более высокое значение ИКД, чем ЛУ всех остальных анатомических групп ($p < 0,01$). ЛУ брюшной полости также показали более высокое значение ИКД, чем в остальных анатомических группах ($p < 0,004$), кроме ЛУ средостения и корней легких. K. de Raere с соавт. [13] обследовали пациентов с НХЛ и пришли к аналогичному выводу – ИКД пораженных ЛУ средостения и брюшной полости выше, чем ИКД ЛУ других анатомических областей, что авторы объясняют эффектом частичного объема и двигательными артефактами, связанными

с дыханием и перистальтикой кишечника. D. Albano с соавт. [14] также установили, что при ЛХ ИКД пораженных ЛУ средостения статистически значимо выше, чем в других анатомических областях. По мнению авторов, ИКД ЛУ средостения может быть завышенным под влиянием сердечной пульсации и дыхания. Других публикаций, где бы сравнивались ИКД ЛУ разных анатомических групп при лимфоме, нами не найдено. В нашем предыдущем исследовании ЛУ средостения визуализировались при ДВИ только у 28 % здоровых лиц, ЛУ корней легких – у 20 %, ЛУ брюшной полости – у всех участников исследования [15]. В то же время при КТ нормальные ЛУ средостения определяются у 77 % здоровых [24]. Следовательно, при ДВИ визуализация нормальных ЛУ средостения и корней легких артефактно снижается. Другие авторы подтверждают, что сердечная пульсация снижает визуализацию на ДВИ-изображениях поражений ЛУ средостения, корней легких, верхних отделов левой доли печени. Значения ИКД при этом могут быть искажены [18]. Кроме влияния сердечной пульсации и дыхания, причиной более высокого ИКД ЛУ средостения и корней легких могут быть отличия в их тканевой структуре. По полученным нами данным, пораженные ЛУ этих групп имеют более низкую клеточность в гистологическом материале по сравнению с ЛУ других локализаций ($p < 0,021$). Таким образом, визуализация нормальных и пораженных при лимфоме ЛУ средостения и корней легких на ДВИ-изображениях снижается, ИКД в них может быть артефактно завышен, вероятной причиной чего является сердечная пульсация.

В ряде публикаций на относительно небольших группах пациентов проведено сравнение ИКД при различных морфологических вариантах лимфом. S. Gümüştaş с соавт. [9] не выявили отличий между значениями ИКД при ЛХ и НХЛ у 15 пациентов. Аналогичные результаты получены в другом исследовании, включившем 5 пациентов с ЛХ и 6 с НХЛ [8]. В указанных работах исследовали только ЛУ средостения и корней легких. M. Sun с соавт. [25] выполнили МРТ-ДВИ всего тела и сообщают, что ИКД поражений при ЛХ (7 пациентов) статистически значимо выше, чем при агрессивных НХЛ (59 пациентов). Согласно полученным нами данным, по результатам обследования 209 человек (наибольшая группа пациентов в опубликованных источниках), ИКД при ЛХ (111 пациентов) выше, чем при НХЛ (98 пациентов), в том числе при агрессивных, индолентных и из клеток мантийной зоны ($p < 0,0002$). Статистически значимое отличие сохраняется после исключения ЛУ средостения и корней легких ($p < 0,003$). По данным T. Kwee с соавт. [7], ИКД ($\times 10^{-3}$ мм²/с) при агрессивных НХЛ (16 пациентов) не отличается от ИКД при индолентных НХЛ (16 пациентов) – 0,74 и 0,67 соответственно. X. Wu с соавт. [26] не выявили отличий ИКД при ДБКЛ (30 пациентов) и фолликулярной лимфоме (11 пациентов). В то же время, по данным F. Mosavi с соавт. [12], ИКД поражений при ЛХ (12 пациентов) составил 1,02, при агрессивных НХЛ (20 пациентов) – 0,82, при индолентных НХЛ (9 пациентов) – 0,60. ИКД при индолентных НХЛ статистически значимо ниже, чем в двух других группах. Это соответствует полученным нами данным на значительно больших группах пациентов: ИКД при ЛХ ($n = 111$) выше, чем при НХЛ ($n = 98$, $p < 0,0002$); при агрессивных НХЛ ($n = 55$) и ДБКЛ ($n = 53$) выше, чем при индолентных ($n = 18$) и из клеток мантийной зоны НХЛ ($n = 25$) ($p < 0,02$); ИКД при индолентных и из клеток мантийной зоны НХЛ не отличается ($p = 0,67$). Более высокому значению ИКД при ЛХ и ДБКЛ по сравнению с индолентными и из клеток мантийной зоны НХЛ соответствует более низкая клеточность первых, что позволяет объяснить полученные нами на клеточном уровне данные.

На заключительном этапе нашего исследования предпринята попытка найти единое пороговое значение ИКД для дифференциации нормальных и пораженных ЛУ у пациентов с лимфомой. Однако большая гетерогенность значений ИКД (их зависимость от различных технических и биологических факторов), продемонстрированная в нашем исследовании, показывает, что решение этой задачи едва ли возможно. Это подтверждается результатами других исследований. Так, пороговые значения ИКД для дифференциации доброкачественной лимфаденопатии и злокачественного поражения ЛУ средостения (у части пациентов имела место лимфома) в работах разных авторов составили ($\times 10^{-3}$ мм²/с) 1,1 [10], 1,33 [27], 1,75 [28], 1,97 [9]. Значительные отличия между пороговыми значениями можно объяснить различием технических параметров сканирования и гетерогенностью включенных заболеваний. В двух работах авторами проведена дифференциальная диагностика саркоидоза и лимфом, с примерно равным соотношением случаев ЛХ и НХЛ, близкими значениями используемых b факторов, однако получены наиболее отличающиеся поро-

говые значения – 1,1 и 1,97 [9, 10]. Следовательно, найти единое пороговое значение ИКД проблематично даже для одной анатомической группы ЛУ. Вместе с тем для диагностики поражения ЛУ при лимфоме высокую эффективность в наших [2, 3, 6] и других исследованиях [29, 30] показал критерий размеров. В заключение отметим, что при интерпретации ПЭТ у пациентов с лимфомой единое пороговое значение стандартизованного показателя накопления также не используют.

Выводы

1. Установлено влияние ряда технических факторов ДВИ-сканирования на значения ИКД пораженных ЛУ при лимфоме: при использовании встроенной катушки ИКД выше, чем при использовании многоканальной поверхностной ($p < 0,0001$); методика параллельной визуализации не влияет на значения ИКД ($p = 0,56$); ИКД подвижных при дыхании ЛУ (средостения и корней легких) при использовании респираторного триггеринга выше, чем при свободном дыхании ($p < 0,02$). Для повышения качества ДВИ-изображений, стандартизации влияния технических параметров сканирования на значения ИКД целесообразно проводить ДВИ-сканирование с использованием поверхностной катушки, методики параллельной визуализации, при свободном дыхании.

2. В зависимости от анатомической локализации пораженных ЛУ наиболее высокие значения ИКД ($\times 10^{-3}$ мм²/с) получены в ЛУ корней легких ($1,429 \pm 0,396$) и средостения ($1,338 \pm 0,313$), более низкие (в порядке уменьшения значений) – в ЛУ брюшной полости ($1,011 \pm 0,298$), подмышечных ($0,840 \pm 0,196$), шеи ($0,834 \pm 0,259$), паховых ($0,753 \pm 0,128$), подвздошных ($0,738 \pm 0,129$). ИКД ЛУ средостения и корней легких статистически значимо не отличаются ($p = 0,37$), но выше, чем в остальных анатомических группах ($p < 0,01$). ИКД ЛУ брюшной полости выше, чем в остальных группах ($p < 0,004$), кроме средостения и корней легких. ИКД ЛУ подмышечных выше, чем подвздошных и паховых ($p < 0,035$). ИКД ЛУ шеи и подмышечных, а также шеи, подвздошных и паховых между собой не отличаются ($p > 0,3$).

Установлено выраженное отличие ИКД ($\times 10^{-3}$ мм²/с) пораженных ЛУ средостения и корней легких от ИКД ЛУ других анатомических групп у того же пациента (средняя разница – $0,382 \pm 0,292$). Средняя разница ИКД ЛУ средостения и корней легких у того же пациента составила $0,360 \pm 0,276$. Отличие ИКД групп ЛУ вне средостения и корней легких у того же пациента значительно ниже – $0,069 \pm 0,051$.

Таким образом, ИКД пораженных ЛУ средостения и корней легких выше, чем в остальных анатомических группах, как при сравнении между пациентами, так и при сравнении разных групп ЛУ у одного пациента.

3. ИКД ($\times 10^{-3}$ мм²/с) пораженных ЛУ при ЛХ составил $1,168 \pm 0,372$, что выше, чем при всех других морфологических вариантах лимфом ($p < 0,0002$). ИКД при агрессивных НХЛ – $0,948 \pm 0,315$, при ДВКЛ – $0,951 \pm 0,320$, что выше, чем при индолентных ($0,756 \pm 0,246$) и из клеток мантийной зоны НХЛ ($0,759 \pm 0,211$), $p < 0,02$. ИКД при индолентных и из клеток мантийной зоны НХЛ не отличаются ($p = 0,67$). После исключения из расчета ЛУ средостения и корней легких, ИКД которых может быть артефактно завышен под влиянием сердечно-сосудистой пульсации, ИКД при ЛХ остается выше, чем при всех других морфологических вариантах лимфом ($p < 0,003$). Следовательно, наряду с сердечно-сосудистой пульсацией высокие значения ИКД при ЛХ могут быть обусловлены другими причинами.

4. При ЛХ более высокому значению ИКД пораженных ЛУ средостения и корней легких соответствует более низкая клеточность в гистологическом материале, чем в пораженных ЛУ других анатомических групп ($p < 0,021$). Более высокому значению ИКД пораженных ЛУ вне средостения и корней легких при ЛХ и ДВКЛ соответствует более низкая клеточность, чем у индолентных и мантийной зоны НХЛ ($p < 0,0001$). Следовательно, установленные отличия значений ИКД пораженных ЛУ у пациентов с ЛХ в зависимости от локализации в средостении и корнях легких или в других анатомических зонах, а также отличия ИКД при различных морфологических вариантах лимфом могут быть хотя бы частично объяснены отличием клеточности, поскольку высокие значения ИКД связывают с низкой клеточностью опухолей.

5. Учитывая установленные статистически значимые отличия ИКД пораженных ЛУ в зависимости от анатомической локализации и морфологического варианта лимфомы, а также влияние

на значения ИКД различных технических факторов ДВИ-сканирования, определить единое пороговое значение ИКД для дифференциации пораженных и нормальных ЛУ не представляется возможным. Использование для этой цели такого критерия, как размер ЛУ по короткой оси, показавшего эффективность в предыдущих исследованиях, является наиболее оптимальным.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Diffusion weighted whole body imaging with background body signal suppression (DWIBS): technical improvement using free breathing, STIR and high resolution 3D display / T. Takahara [et al.] // *Radiat. Med.* – 2004. – Vol. 22, N 4. – P. 275–282.
2. Сравнение возможностей диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии всего тела и рентгеновской компьютерной томографии при стадировании лимфом / С. А. Хоружик [и др.] // *Онкол. журн.* – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 43–48.
3. Диффузионно-взвешенная магнитно-резонансная томография всего тела и позитронная эмиссионная томография, комбинированная с компьютерной томографией, при стадировании лимфом / С. А. Хоружик [и др.] // *Вестн. рентгенологии и радиологии.* – 2019. – Т. 100, № 6. – С. 321–334.
4. Хоружик, С. А. Проспективное исследование прогностической эффективности диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии при лимфоме Ходжкина / С. А. Хоружик, Э. А. Жаврид // *Онкол. журн.* – 2020. – Т. 14, № 2–3. – С. 52–67.
5. Хоружик, С. А. Проспективное исследование прогностической эффективности диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии при неходжкинских лимфомах / С. А. Хоружик, Э. А. Жаврид // *Евраз. онкол. журн.* – 2020. – Т. 8, № 3. – С. 220–238.
6. Сравнение диагностической эффективности магнитно-резонансной томографии с диффузионно-взвешенным исследованием всего тела и позитронной эмиссионной томографии/компьютерной томографии при определении степени регрессии лимфомы после завершения химиотерапии: Минская шкала и шкала Довиль / С. А. Хоружик [и др.] // *Лучевая диагностика и терапия.* – 2020. – № 1. – С. 78–92.
7. ADC measurements in the evaluation of lymph nodes in patients with non-Hodgkin lymphoma: feasibility study / T. C. Kwee [et al.] // *MAGMA.* – 2011. – Vol. 24, N 1. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10334-010-0226-7>
8. Characterization of mediastinal lymphadenopathy with diffusion-weighted imaging / A. A. Abdel Razek [et al.] // *Magn. Reson. Imaging.* – 2011. – Vol. 29, N 2. – P. 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2010.08.002>
9. Differentiation of lymphoma versus sarcoidosis in the setting of mediastinal-hilar lymphadenopathy: assessment with diffusion-weighted MR imaging / S. Gümüştaş [et al.] // *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* – 2013. – Vol. 30, N 1. – P. 52–59.
10. Дифференциальная диагностика медиастинальной лимфаденопатии при лимфоме и саркоидозе с помощью диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии / А. В. Сударкина // *Лучевая диагностика и терапия.* – 2020. – № 3. – С. 56–62.
11. Diagnostic ability of apparent diffusion coefficients for lymphomas and carcinomas in the pharynx / M. Sumi [et al.] // *Eur. Radiol.* – 2007. – Vol. 17, N 10. – P. 2631–2637. <https://doi.org/10.1007/s00330-007-0588-z>
12. Whole-body diffusion-weighted MRI and (18)F-FDG PET/CT can discriminate between different lymphoma subtypes / F. Mosavi [et al.] // *Clin. Radiol.* – 2015. – Vol. 70, N 11. – P. 1229–1236. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2015.06.087>
13. Improving lymph node characterization in staging malignant lymphoma using first-order ADC texture analysis from whole-body diffusion-weighted MRI / K. N. De Paepe [et al.] // *J. Magn. Reson. Imaging.* – 2018. – Vol. 48, N 4. – P. 897–906. <https://doi.org/10.1002/jmri.26034>
14. Whole-body diffusion-weighted MR and FDG-PET/CT in Hodgkin lymphoma: predictive role before treatment and early assessment after two courses of ABVD / D. Albano [et al.] // *Eur. J. Radiol.* – 2018. – Vol. 103. – P. 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.04.014>
15. Хоружик, С. А. Диффузионно-взвешенная магнитно-резонансная томография нормальных лимфатических узлов / С. А. Хоружик // *Евраз. онкол. журн.* – 2020. – Т. 8, № 1. – С. 30–39.
16. Корреляция магнитно-резонансно-томографического измеряемого коэффициента диффузии с показателем клеточности в гистологическом материале при различных морфологических вариантах лимфом / С. А. Хоружик [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии.* – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 102–112.
17. Meyer, H. J. ADC histogram analysis of muscle lymphoma-correlation with histopathology in a rare entity / H. J. Meyer, N. Pazaitis, A. Surov // *Br. J. Radiol.* – 2018. – Vol. 91, N 1090. – Art. 20180291. <https://doi.org/10.1259/bjr.20180291>
18. Pitfalls in whole body MRI with diffusion weighted imaging performed on patients with lymphoma: What radiologists should know / D. Albano [et al.] // *Magn. Reson. Imaging.* – 2016. – Vol. 34, N 7. – P. 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2016.04.023>
19. Исследование внутриоператорской и межоператорской воспроизводимости измеряемого коэффициента диффузии при лимфомах / С. А. Хоружик [и др.] // *Онкол. журн.* – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 77–85.
20. Diffusion-weighted imaging outside the brain: Consensus statement from an ISMRM-sponsored workshop / B. Taouli [et al.] // *J. Magn. Reson. Imaging.* – 2016. – Vol. 44, N 3. – P. 521–540. <https://doi.org/10.1002/jmri.25196>
21. Hamilton, J. Recent advances in parallel imaging for MRI / J. Hamilton, D. Franson, N. Seiberlich // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* – 2017. – Vol. 101. – P. 71–95. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.04.002>
22. The role of parallel diffusion-weighted imaging and apparent diffusion coefficient (ADC) map values for evaluating breast lesions: preliminary results / G. Jin [et al.] // *Acad. Radiol.* – 2010. – Vol. 17, N 4. – P. 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2009.12.004>
23. Evaluation of image quality of DWIBS versus DWI sequences in thoracic MRI at 3T / C. Mesmann [et al.] // *Magn. Reson. Imaging.* – 2014. – Vol. 32, N 10. – P. 1237–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2014.08.015>

24. Шепелева, Л. П. Компьютерно-томографическая картина неизмененных лимфатических узлов средостения у детей, не инфицированных микобактериями туберкулеза / Л. П. Шепелева, И. Е. Тюрин // Вестн. рентгенологии и радиологии. – 2014. – № 4. – С. 26–30.

25. Application of DWIBS in malignant lymphoma: correlation between ADC values and Ki-67 index / M. Sun [et al.] // Eur. Radiol. – 2018. – Vol. 28, N 4. – P. 1701–1708. <https://doi.org/10.1007/s00330-017-5135-y>

26. Differentiation of diffuse large B-cell lymphoma from follicular lymphoma using texture analysis on conventional MR images at 3.0 Tesla / X. Wu [et al.] // Acad. Radiol. – 2016. – Vol. 23, N 6. – P. 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2016.01.012>

27. Apparent diffusion coefficient measurement in mediastinal lymphadenopathies: differentiation between benign and malignant lesions / F. E. Ustabasioglu [et al.] // J. Clin. Imaging Sci. – 2017. – Vol. 7. – Art. 12. https://doi.org/10.4103/jcis.JCIS_84_16

28. Diffusion-weighted quantitative MRI to diagnose benign conditions from malignancies of the anterior mediastinum: Improvement of diagnostic accuracy by comparing perfusion-free to perfusion-sensitive measurements of the apparent diffusion coefficient / A. M. Priola [et al.] // J. Magn. Reson. Imaging. – 2016. – Vol. 44, N 3. – P. 758–769. <https://doi.org/10.1002/jmri.25203>

29. Whole-body MRI, including diffusion-weighted imaging, for staging lymphoma: comparison with CT in a prospective multicenter study / T. C. Kwee [et al.] // J. Magn. Reson. Imaging. – 2014. – Vol. 40, N 1. – P. 26–36. <https://doi.org/10.1002/jmri.24356>

30. Ionising radiation-free whole-body MRI versus (18)F-fluorodeoxyglucose PET/CT scans for children and young adults with cancer: a prospective, non-randomised, single-centre study / C. Klenk [et al.] // Lancet Oncol. – 2014. – Vol. 15, N 3. – P. 275–285. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70021-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70021-X)

References

1. Takahara T., Imai Y., Yamashita T., Yasuda S., Nasu S., van Cauteren M. Diffusion weighted whole body imaging with background body signal suppression (DWIBS): technical improvement using free breathing, STIR and high resolution 3D display. *Radiation Medicine*, 2004, vol. 22, no. 4, pp. 275–282.

2. Khoruzhik S. A., Zhavrid E. A., Sachivko N. V., Portasova N. P., Karman E. I., Karman A. V. Possibilities of whole-body diffusion-weighted magnetic resonance imaging compared to X-ray computed tomography in staging lymphoma. *Onkologicheskii zhurnal* [Oncological journal], 2015, vol. 9, no. 1, pp. 43–48 (in Russian).

3. Khoruzhik S. A., Zhavrid E. A., Dzyuban A. V., Poddubnyi K. V., Sukolinskaya E. V., Kalenik O. A. Whole body diffusion-weighted magnetic resonance imaging and positron emission tomography/computed tomography for staging of lymphomas. *Vestnik rentgenologii i radiologii* [Bulletin of radiology and radiology], 2019, vol. 100, no. 6, pp. 321–334 (in Russian).

4. Khoruzhik S. A., Zhavrid E. A. Prospective study of prognostic effectiveness of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in Hodgkin lymphoma. *Onkologicheskii zhurnal* [Oncological journal], 2020, vol. 14, no. 2–3, pp. 52–67 (in Russian).

5. Khoruzhik S. A., Zhavrid E. A. Prospective study of prognostic effectiveness of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in non-Hodgkin lymphomas. *Evrasiiskii onkologicheskii zhurnal* [Eurasian oncological journal], 2020, vol. 8, no. 3, pp. 220–238 (in Russian).

6. Khoruzhik S. A., Zhavrid E. A., Dzyuban A. V., Sukolinskaya E. V., Kalenik O. A. Comparison of the diagnostic effectiveness of whole body magnetic resonance imaging with diffusion weighted imaging and positron emission tomography/computed tomography in determining tumor response in lymphoma after the end of chemotherapy: Minsk scale and Deauville scale. *Luchevaya diagnostika i terapiya* [Radiation diagnostics and therapy], 2020, no. 1, pp. 78–92 (in Russian).

7. Kwee T. C., Ludwig I., Uiterwaal C. S., van Ufford H. M. E., Vermoolen M. A., Fijnheer R., Bierings M. B., Nieuwstein R. A. J. ADC measurements in the evaluation of lymph nodes in patients with non-Hodgkin lymphoma: feasibility study. *MAGMA*, 2011, vol. 24, no. 1, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10334-010-0226-7>

8. Abdel Razek A. A., Elkammary S., Elmorsy A. S., Elshafey M., Elhadey T. Characterization of mediastinal lymphadenopathy with diffusion-weighted imaging. *Magnetic Resonance Imaging*, 2011, vol. 29, no. 2, pp. 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2010.08.002>

9. Gümüştas S., Inan N., Akansel G., Başıyğit I., Ciftçi E. Differentiation of lymphoma versus sarcoidosis in the setting of mediastinal-hilar lymphadenopathy: assessment with diffusion-weighted MR imaging. *Sarcoidosis Vascular Diffuse Lung Disease*, 2013, vol. 30, no. 1, pp. 52–59.

10. Sudarkina A. V., Dergilev A. P., Kozlov V. V., Fokina Yu. A., Klimova I. P., Gorbunov N. A., Shalygin K. V. Differential diagnosis of mediastinal lymphadenopathy in lymphoma and sarcoidosis using magnetic resonance imaging. *Luchevaya diagnostika i terapiya* [Radiation diagnostics and therapy], 2020, no. 3, pp. 56–62 (in Russian).

11. Sumi M., Ichikawa Y., Nakamura T. Diagnostic ability of apparent diffusion coefficients for lymphomas and carcinomas in the pharynx. *European Radiology*, 2007, vol. 17, no. 10, pp. 2631–2637. <https://doi.org/10.1007/s00330-007-0588-z>

12. Mosavi F., Wassberg C., Selling J., Molin D., Ahlström H. Whole-body diffusion-weighted MRI and (18)F-FDG PET/CT can discriminate between different lymphoma subtypes. *Clinical Radiology*, 2015, vol. 70, no. 11, pp. 1229–1236. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2015.06.087>

13. De Paepe K. N., De Keyzer F., Wolter P., Bechter O., Dierickx D., Janssens A. [et al.]. Improving lymph node characterization in staging malignant lymphoma using first-order ADC texture analysis from whole-body diffusion-weighted MRI. *Journal Magnetic Resonance Imaging*, 2018, vol. 48, no. 4, pp. 897–906. <https://doi.org/10.1002/jmri.26034>

14. Albano D., Patti C., Matranga D., Lagalla R., Midiri M., Galia M. Whole-body diffusion-weighted MR and FDG-PET/CT in Hodgkin lymphoma: predictive role before treatment and early assessment after two courses of ABVD. *European Journal of Radiology*, 2018, vol. 103, pp. 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.04.014>

15. Khoruzhik S. A. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of normal lymph nodes. *Evrasiiskii onkologicheskii zhurnal* [Eurasian oncological journal], 2020, vol. 8, no. 1, pp. 30–39 (in Russian).

16. Khoruzhik S. A., Aniskevich O. R., Zhavrid E. A. Correlation of the magnetic resonance imaging apparent diffusion coefficient with the cellularity in the histological material in different morphological types of lymphomas. *Problemy zdorov'ya i ekologii* [Health and environmental issues], 2021, vol. 18, no. 2, pp. 102–112 (in Russian).
17. Meyer H. J., Pazaitis N., Surov A. ADC histogram analysis of muscle lymphoma-correlation with histopathology in a rare entity. *British Journal of Radiology*, 2018, vol. 91, no. 1090, art. 20180291. <https://doi.org/10.1259/bjr.20180291>
18. Albano D., La Grutta L., Grassettoni E., Patti C., Lagalla R., Midiri M., Galia M. Pitfalls in whole body MRI with diffusion weighted imaging performed on patients with lymphoma: What radiologists should know. *Magnetic Resonance Imaging*, 2016, vol. 34, no. 7, pp. 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2016.04.023>
19. Khoruzhik S. A., Zhavrid E. A., Karman A. V., Shimanets S. V., Yatskov N. N. Investigation of intra- and inter-observer reproducibility of the apparent diffusion coefficient in lymphomas. *Onkologicheskii zhurnal* [Oncological journal], 2016, vol. 10, no. 3, pp. 77–85 (in Russian).
20. Taouli B., Beer A. J., Chenevert T., Collins D., Lehman C., Matos C. [et al.] Diffusion-weighted imaging outside the brain: Consensus statement from an ISMRM-sponsored workshop. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2016, vol. 44, no. 3, pp. 521–540. <https://doi.org/10.1002/jmri.25196>
21. Hamilton J., Franson D., Seiberlich N. Recent advances in parallel imaging for MRI. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 2017, vol. 101, pp. 71–95. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.04.002>
22. Jin G., An N., Jacobs M. A., Li K. The role of parallel diffusion-weighted imaging and apparent diffusion coefficient (ADC) map values for evaluating breast lesions: preliminary results. *Academic Radiology*, 2010, vol. 17, no. 4, pp. 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2009.12.004>
23. Mesmann C., Sigovan M., Berner L.-P., Abergel A., Tronc F., Berthezène Y., Douek P., Boussel L. Evaluation of image quality of DWIBS versus DWI sequences in thoracic MRI at 3T. *Magnetic Resonance Imaging*, 2014, vol. 32, no. 10, pp. 1237–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2014.08.015>
24. Shepeleva L. P., Tyurin I. E. Computed tomography pattern of unchanged mediastinal lymph nodes in children with uninfected Mycobacterium tuberculosis. *Vestnik rentgenologii i radiologii* [Bulletin of radiology and radiology], 2014, no. 4, pp. 26–30 (in Russian).
25. Sun M., Cheng J., Zhang Y., Bai J., Wang F., Meng Y., Li Z. Application of DWIBS in malignant lymphoma: correlation between ADC values and Ki-67 index. *European Radiology*, 2018, vol. 28, no. 4, pp. 1701–1708. <https://doi.org/10.1007/s00330-017-5135-y>
26. Wu X., Sikiö M., Pertovaara H., Järvenpää R., Eskola H., Dastidar P., Kellokumpu-Lehtinen P.-L. Differentiation of diffuse large B-cell lymphoma from follicular lymphoma using texture analysis on conventional MR Images at 3.0 Tesla. *Academic Radiology*, 2016, vol. 23, no. 6, pp. 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2016.01.012>
27. Ustabasioglu F. E., Samanci C., Alis D., Samanci N. S., Kula O., Olgun D. C. Apparent diffusion coefficient measurement in mediastinal lymphadenopathies: differentiation between benign and malignant lesions. *Journal of Clinical Imaging Sciences*, 2017, vol. 7, art. 12. https://doi.org/10.4103/jcis.JCIS_84_16
28. Priola A. M., Priola S. M., Gned D., Piacibello E., Sardo D., Parvis G., Torti D., Ardissoni F., Veltri A. Diffusion-weighted quantitative MRI to diagnose benign conditions from malignancies of the anterior mediastinum: Improvement of diagnostic accuracy by comparing perfusion-free to perfusion-sensitive measurements of the apparent diffusion coefficient. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2016, vol. 44, no. 3, pp. 758–769. <https://doi.org/10.1002/jmri.25203>
29. Kwee T. C., Vermoolen M. A., Akkerman E. A., Kersten M. J., Fijnheer R., Ludwig I. [et al.] Whole-body MRI, including diffusion-weighted imaging, for staging lymphoma: comparison with CT in a prospective multicenter study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2014, vol. 40, no. 1, pp. 26–36. <https://doi.org/10.1002/jmri.24356>
30. Klenk C., Gawande R., Uslu L., Khurana A., Qiu D., Quon A., Donig J., Rosenberg J., Luna-Fineman S., Moseley M., Daldrup-Link H. E. Ionising radiation-free whole-body MRI versus (18)F-fluorodeoxyglucose PET/CT scans for children and young adults with cancer: a prospective, non-randomised, single-centre study. *Lancet Oncology*, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 275–285. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70021-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70021-X)

Информация об авторах

Хоружик Сергей Анатольевич – канд. мед. наук, доцент. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, а/г Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: skharuzhyk@nld.by. <https://orcid.org/0000-0002-0010-8324>

Карман Андрей Вениаминович – канд. мед. наук, доцент. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, а/г Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: carman@tut.by. <https://orcid.org/0000-0002-3045-3882>

Жаврид Эдвард Антонович – д-р мед. наук, профессор. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, а/г Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: e.zhavrid@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-2194-4820>

Information about the authors

Siarhei A. Kharuzhyk – Ph. D. (Med.), Associate Professor. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: skharuzhyk@nld.by. <https://orcid.org/0000-0002-0010-8324>

Andrey V. Karman – Ph. D. (Med.), Associate Professor. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: carman@tut.by. <https://orcid.org/0000-0002-3045-3882>

Edward A. Zhavrid – D. Sc. (Med.), Professor. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: e.zhavrid@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-2194-4820>

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.24-002-053.32-076-036:616.151.5

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-84-90>

Поступила в редакцию 21.06.2021

Received 21.06.2021

А. Н. Горячко, А. В. Сукало

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО СИНДРОМА У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С ВРОЖДЕННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Аннотация. Одним из основных осложнений врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных, приводящих к высокой смертности, является развитие геморрагического синдрома. Цель исследования – определить прогностическую значимость показателей свертывания крови для определения вероятности развития геморрагического синдрома у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией.

Проведена оценка показателей гемостаза у 221 недоношенного новорожденного, находившегося на лечении и выхаживании в РНПЦ «Мать и дитя» в период с 2017 по 2019 г. Выполнен сравнительный анализ показателей коагулограммы первых суток жизни с определением процентильного размаха, при этом абсолютные значения переведены в бинарные переменные. По результатам ROC-анализа разработаны математическая модель с универсальным коэффициентом, равным $\chi^2 = 24,19$, $p = 0,004$, с чувствительностью 92,9 %, площадью под ROC-кривой $AUC = 0,69 \pm 0,039$ (0,62–0,76), $p < 0,001$, и компьютерная программа сопровождения для врачей. Рассчитана прогностическая значимость показателей свертывания крови: активированного частичного тромбопластинового времени – 0,366, коэффициента R – 0,208, протромбинового времени – 0,321, протромбинового индекса по Квику – 0,330, международного нормализованного отношения – 0,242, тромбинового времени – 0,319, фибриногена – 0,295, D-димера – 0,448, тромбоцитов – 0,478, что позволяет отнести недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией при пороговом значении $\geq 0,293$ к группе риска по развитию геморрагического синдрома.

Ключевые слова: недоношенные новорожденные, врожденная пневмония, гемостаз, коагулограмма, ROC-анализ

Для цитирования: Горячко, А. Н. Прогностическая значимость показателей свертывания крови для определения вероятности развития геморрагического синдрома у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией / А. Н. Горячко, А. В. Сукало // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 84–90. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-84-90>

Alexander N. Harachka, Alexander V. Sukalo

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF BLOOD CLOTTING INDICATORS FOR DETERMINATION OF THE PROBABILITY OF DEVELOPING THE HEMORRHAGIC SYNDROME IN PREMATURE NEWBORNS WITH CONGENITAL PNEUMONIA

Abstract. One of the main complications of congenital pneumonia in premature newborns, leading to high mortality, is the development of hemorrhagic syndrome. Objective – to determine the prognostic significance of blood clotting indicators and the probability of developing hemorrhagic syndrome in premature newborns with congenital pneumonia.

The assessment of hemostasis indicators in 221 premature newborns who were treated and cared for in the State Institution RSPC “Mother and Child” in the period from 2017 to 2019 was carried out. A comparative analysis of the parameters of the coagulogram of the first day of life was performed with the allocation of the percentile range and the translation of absolute values into binary variables is made. Based on the results of the ROC analysis, a mathematical model was developed with a universal coefficient equal to $\chi^2 = 24.19$, $p = 0.004$, with a sensitivity of 92.9 % and an area under the ROC-curve $AUC = 0.69 \pm 0.039$ (0.62–0.76), $p < 0.001$, and a computer support program for doctors. The prognostic significance of blood clotting parameters was calculated: activated partial thromboplastin time – 0.366, coefficient R – 0.208, prothrombin time – 0.321, prothrombin index according to Quick – 0.330, international normalized ratio – 0.242, thrombin time – 0.319, fibrinogen – 0.295, D-dimer – 0.448, platelets – 0.478, which makes it possible to allocate premature newborns with congenital pneumonia with a threshold value of ≥ 0.293 to the risk group for the development of hemorrhagic syndrome.

Keywords: premature newborns, congenital pneumonia, hemostasis, coagulogram, ROC-analysis

For citation: Harachka A. N., Sukalo A. V. Prognostic significance of blood clotting indicators for determination of the probability of developing the hemorrhagic syndrome in premature newborns with congenital pneumonia. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 84–90 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-84-90>

Введение. По результатам многоцентрового исследования в Канаде у недоношенных новорожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела частота всех случаев внутрижелудочковых кровоизлияний (ВЖК) колебалась от 31 до 36 %, а тяжелая форма ВЖК отмечалась в 10–17 % случаев. Выраженные поражения ЦНС и летальные исходы у новорожденных с тяжелым ВЖК были в 4 раза выше, чем у младенцев с более легкой степенью ВЖК [1].

Согласно статистическим данным, в Соединенных Штатах Америки у недоношенных новорожденных с экстремально низкой массой тела ВЖК встречалось в 45 % случаев. У 45–85 % недоношенных детей со средней и тяжелой степенью кровоизлияния развивались поражения ЦНС, требующие в последующем специального лечения и длительной реабилитации [2].

Цель исследования – определить прогностическую значимость показателей свертывания крови и вероятность развития геморрагического синдрома у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией.

Объекты и методы исследования. Проведено обследование 221 недоношенного младенца, находившегося в отделении анестезиологии и реанимации (с палатами для новорожденных детей) и педиатрическом отделении для недоношенных новорожденных ГУ «РНПЦ «Мать и дитя». Новорожденные поступали на лечение и выхаживание из 22 роддомов и отделений анестезиологии и реанимации учреждений здравоохранения Республики Беларусь в период с 2017 по 2019 г.

Метод исследования – проспективное клиническое исследование.

Все новорожденные были разделены на три группы.

Первую исследуемую группу составили 55 новорожденных, родившихся в сроке гестации 35,0 (33,0; 36,0) недель, с низкой массой тела при рождении (2080,0 (1870,0; 2420,0) г), синдромом дыхательных расстройств и врожденной пневмонией, длиной тела 45,0 (42,0; 46,0) см, окружностью головы 31,0 (31,0; 33,0) см и окружностью груди 30,0 (28,0; 31,0) см.

Во вторую исследуемую группу было включено 113 недоношенных новорожденных, родившихся в сроке гестации 28,0 (27,0; 30,0) недель, с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении (990,0 (880,0; 1350,0) г), синдромом дыхательных расстройств и врожденной пневмонией, длиной тела 36,0 (34,0; 39,0) см, окружностью головы 26,0 (25,0; 28,0) см и окружностью груди 23,0 (22,0; 25,0) см.

В группу сравнения вошли 53 условно здоровых недоношенных, родившихся в сроке гестации 35,0 (35,0; 36,0) недель, с низкой массой тела при рождении (2300,0 (2140,0; 2400,0) г), синдромом дыхательных расстройств, длиной тела 45,0 (45,0; 47,0) см, окружностью головы 32,0 (31,0; 33,0) см и окружностью груди 30,0 (29,0; 32,0) см.

Критерии постановки диагноза «врожденная пневмония»: клинические и лабораторные данные, наличие инфильтративных теней на рентгенограмме легких в первые 72 ч жизни. Критериями исключения являлись: антенатально выявленные пороки развития, наличие генетических заболеваний и хромосомной патологии, рождение в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий.

Гемостазиограмму выполняли на четырехканальном автоматическом коагулометре ACL 10000 (Instrumentation Laboratory, США). Показатели гемостаза в плазме крови исследовали с применением реагентов Hemosil (Normal Control Assayed, США), определение D-димера (DD) в сыворотке крови – с помощью полуавтоматического биохимического анализатора Clima MC-15 (Испания), используя турбидиметрический метод и реагенты производителя (Cormau, Польша). В гемостазиограмме оценивали показатели активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), коэффициента АЧТВ (R), протромбинового времени (ПВ), протромбинового индекса по Квику (ПИ), международного нормализованного отношения (МНО), тромбинового времени (ТВ), фибриногена (FF) и DD. Для определения уровня тромбоцитов (PLT) применяли гематологический анализатор Horiba ABX Pentra 60 (Франция).

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакетов программ Statistica 10 и Microsoft Excel. Нормальность распределения количественных признаков оценивали с помощью тестов Колмогорова–Смирнова и Лиллиефорса. При нормальном распределении величин рассчитывали среднее и его среднеквадратичное отклонение ($M \pm SD$) с указанием доверительного

интервала ($\pm 95,5\%$ CI), критерий Стьюдента (t), при отличном от нормального – медиану (Me), интерквартильный размах (25 %; 75 %) и интервал процентильного размаха (P) (5,0 % – 95,0 %) критерий Манна–Уитни (U). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [3].

Прогностическую ценность каждого из факторов и всей совокупности факторов ROC-кривой оценивали с помощью бинарной логистической регрессии, при условии отсутствия между факторами статистически значимых корреляционных связей, отрицательного удвоенного логарифма функции правдоподобия ($-2LL$) и меры определенности (R2 Нэйджелкерка) [4].

Карты обследования новорожденных детей и информированное согласие родителей на выполнение исследований были утверждены на заседании комиссии по медицинской этике ГУ «РНПЦ «Мать и дитя». Получено информированное согласие законных представителей каждого из обследованных новорожденных.

Результаты и их обсуждение. Основными заболеваниями в группе сравнения являлись: дыхательное расстройство (код МКБ-10: P22) у 37 (69,8 %) и неонатальная желтуха (код МКБ-10: P59) у 16 (30,2 %) младенцев. В первой исследуемой группе наблюдались: врожденная пневмония (код МКБ-10: P23) – у 55 (100,0 %) новорожденных, инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода (код МКБ-10: P37, P39), – у 29 (52,7 %), бронхолегочная дисплазия (БЛД) (код МКБ-10: P27.1) – у 1 (1,8 %) младенца. Во второй исследуемой группе врожденная пневмония регистрировалась у 113 (100,0 %) новорожденных, БЛД – у 61 (54,0 %), инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода, – у 47 (41,6 %), врожденный сепсис (код МКБ-10: P36) – у 13 (11,5 %) младенцев.

В группе условно здоровых младенцев регистрировались следующие виды геморрагических расстройств: ВЖК I степени – у 3 (5,7 %) новорожденных, геморрагический синдром – у 3 (5,7 %). В первой исследуемой группе ВЖК I степени наблюдались у 11 (20,0 %) новорожденных, III степени – у 3 (5,5 %), геморрагический синдром – у 10 (18,2 %) младенцев. Во второй исследуемой группе ВЖК I степени регистрировались у 36 (31,9 %) новорожденных, II степени – у 11 (9,7 %), III степени – у 11 (9,7 %) и IV степени – у 5 (4,4 %), геморрагический синдром – у 36 (31,9 %) младенцев.

Проведен анализ показателей свертываемости крови у недоношенных новорожденных в первые двое суток жизни (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Показатели коагулограммы недоношенных новорожденных на 1–2-е сутки жизни, Me (25 %; 75 %); P (5,0 %–95,0 %)

Table 1. Indicators of the coagulograms of the premature newborns for 1–2 days of life, Me (25 %; 75 %); P (5.0 %–95.0 %)

Показатель	Вторая исследуемая группа ($n = 113$)	Первая исследуемая группа ($n = 55$)	Группа сравнения ($n = 53$)	Статистическая значимость различий
АЧТВ, с	47,8 (42,5; 56,4); (33,8–74,0)	47,1 (41,7; 57,1); (32,2–68,7)	38,2 (36,5; 43,5); (33,2–55,5)	$H = 33,6, p < 0,001$; $z_{2-4} = 5,5, p < 0,001$; $z_{3-4} = 4,8, p < 0,001$
Коэффициент R	1,7 (1,5; 1,9); (1,2–2,6)	1,7 (1,5; 2,0); (1,2–2,5)	1,4 (1,3; 1,6); (1,2–2,1)	$H = 30,1, p < 0,001$; $z_{2-4} = 5,2, p < 0,001$; $z_{3-4} = 4,4, p < 0,001$
ПВ, с	20,0 (17,7; 22,8); (15,8–28,8)	21,4 (18,5; 24,4); (15,6–29,0)	18,5 (17,5; 19,6); (16,3–21,8)	$H = 18,8, p < 0,001$; $z_{2-4} = 3,4, p = 0,002$; $z_{3-4} = 4,2, p < 0,001$
ПИ, %	50,5 (43,8; 64,9); (32,0–78,2)	56,0 (44,5; 64,3); (34,4–76,0)	64,2 (57,6; 68,8); (47,2–77,4)	$H = 21,6, p < 0,001$; $z_{2-4} = 4,6, p < 0,001$; $z_{3-4} = 3,2, p = 0,004$
МНО	1,7 (1,4; 1,9); (1,2–2,7)	1,6 (1,4; 1,9); (1,3–2,6)	1,4 (1,3; 1,5); (1,2–1,9)	$H = 25,0, p < 0,001$; $z_{2-4} = 4,7, p < 0,001$; $z_{3-4} = 4,1, p < 0,001$
ТВ, с	26,9 (23,4; 30,5); (17,4–39,4)	28,3 (24,3; 30,9); (20,9–47,7)	22,5 (21,0; 23,9); (19,2–27,2)	$H = 42,7, p < 0,001$; $z_{2-4} = 5,5, p < 0,001$; $z_{3-4} = 6,1, p < 0,001$

Окончание табл. 1

Показатель	Вторая исследуемая группа (n = 113)	Первая исследуемая группа (n = 55)	Группа сравнения (n = 53)	Статистическая значимость различий
FF, г/л	1,9 (1,4; 2,4); (0,9–6,0)	2,3 (1,8; 2,9); (1,3–3,9)	2,7 (2,3; 3,1); (1,9–3,7)	$H = 28,9, p < 0,001$; $z_{2,4} = 5,3, p < 0,001$; $z_{3,4} = 2,6, p = 0,032$
DD, мкг/мл	4,1 (2,2; 6,2); (0,8–10,1)	2,5 (1,8; 3,7); (1,1–16,2)	1,5 (1,2; 1,9); (0,6–3,5)	$H = 51,0, p < 0,001$; $z_{2,4} = 7,1, p < 0,001$; $z_{3,4} = 4,6, p < 0,001$
PLT, $\times 10^9$ /л	191,0 (149,0; 223,0); (112,0–263,0)	221,0 (172,0; 261,0); (130,0–306,0)	237,0 (203,0; 292,0); (158,0–403,0)	$H = 31,1, p < 0,001$; $z_{2,3} = 3,2, p = 0,004$; $z_{2,4} = 5,3, p < 0,001$

В первые двое суток жизни у недоношенных новорожденных исследуемых групп по сравнению с данными коагулограмм группы сравнения отмечались статистически более высокие значения АЧТВ ($p < 0,001, p < 0,001$), коэффициента R ($p < 0,001, p < 0,001$), ПВ ($p = 0,002, p < 0,001$), МНО ($p < 0,001, p < 0,001$), ТВ ($p < 0,001, p < 0,001$), DD ($p = 0,002, p < 0,001$) на фоне низких значений ПИ ($p < 0,001, p < 0,001$), FF ($p < 0,001, p = 0,032$) и PLT ($p = 0,004, p < 0,001$), что свидетельствовало о выраженной гипокоагуляции во всех фазах свертывания крови и повышенном фибринолизе. Данная картина нарушения функции свертывающей и противосвертывающей систем крови соответствует второй и третьей фазам диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС) [5–10].

Для определения границ нормального колебания показателей свертывания крови были использованы данные коагулограмм условно здоровых недоношенных новорожденных, находящиеся в интервале 5 %–95 % процентильного размаха. Выполнен перевод количественных показателей в бинарные переменные. Выбраны следующие цифры, выходящие за границы процентильного размаха у младенцев группы сравнения: АЧТВ – $>55,5$; коэффициент R – $>2,1$; ПВ – $>21,8$; ПИ – $<47,2$; МНО – $>1,9$; ТВ – $>27,2$; FF – $<1,9$; DD – $>3,5$; PLT – <150 .

Результатом обработки бинарных показателей свертывания крови с помощью логистической регрессии и ROC-анализа выведена математическая модель с универсальным критерием коэффициента $\chi^2 = 24,19, p = 0,004$, что свидетельствует о ее высокой статистической значимости. Выбор модели проводился с учетом числа пациентов и возможностью получения максимальных значений чувствительности и специфичности (табл. 2).

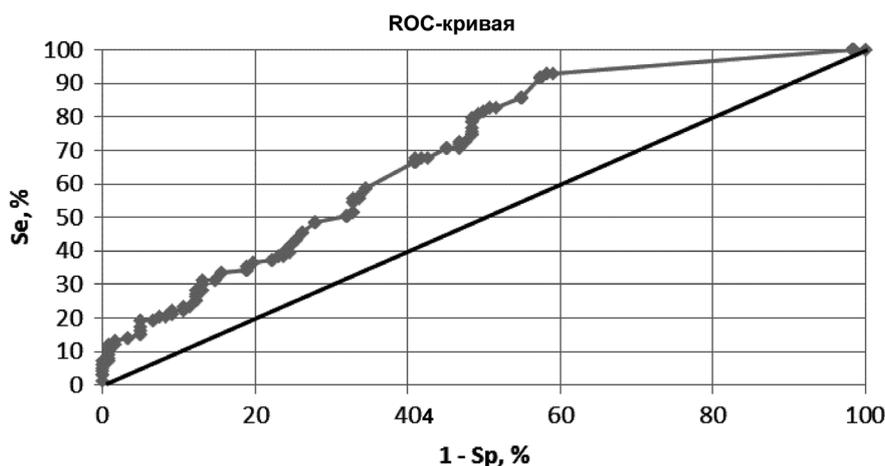
Таблица 2. Переменные в уравнении прогностической модели

Table 2. Variables in the predictive model equation

Переменная	B	S. E.	Wald	df	Sig	EXP (B)	95 % CI for EXP (B)	
							Lower	Upper
АЧТВ	0,464	0,575	0,652	1	0,420	1,591	0,515	4,908
R	-0,330	0,652	0,256	1	0,613	0,719	0,200	2,581
ПВ	0,259	0,425	0,371	1	0,542	1,295	0,563	2,979
ПИ	0,299	0,433	0,477	1	0,490	1,348	0,578	3,147
МНО	-0,131	0,547	0,057	1	0,811	0,877	0,300	2,565
ТВ	0,250	0,355	0,496	1	0,481	1,284	0,640	2,577
FF	0,137	0,327	0,175	1	0,675	1,147	0,604	2,176
DD	0,801	0,295	7,352	1	0,007	2,227	1,249	3,973
PLT	0,923	0,423	4,771	1	0,029	2,517	1,099	5,764
Константа	-1,013	0,237	18,266	1	0,000	0,363		

Для представления работоспособности разработанной математической модели вероятности развития гемorragических расстройств при врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с различной массой тела приведены параметры с указанием отрицательного удвоенного логарифма функции правдоподобия (279,79) и меры определенности (0,139):

$$p = 1/(1 + e^{-1,01 + 0,46AЧТВ - 0,33R + 0,26ПВ + 0,3ПИ - 0,13МНО + 0,25ТВ + 0,14FF + 0,8DD + 0,92PLT}).$$



ROC-кривая модели вероятности развития геморрагического синдрома при врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с различной массой тела

ROC-curve of the model of the probability of developing the hemorrhagic syndrome in premature newborns with congenital pneumonia in different body weight

Количественные показатели, выходящие за интервал процентильного размаха условно здоровых недоношенных (АЧТВ > 55,5; коэффициент R > 2,1; ПВ > 21,8; ПИ < 47,2; МНО > 1,9; ТВ > 27,2; FF < 1,9; DD > 3,5; PLT < 150), шифровали в бинарные значения как «1», находящиеся в нормативном интервале – как «0».

ROC-кривая (см. рисунок), являясь графической характеристикой качества бинарного классификатора, указывает на зависимость доли верных положительных результатов от доли ложных положительных результатов при варьировании значений оптимального порога [4]. На данной кривой оптимальный порог $\geq 0,293$. Наличие фактора или совокупности факторов с пороговыми значениями выше 0,293 указывает на высокую вероятность развития геморрагического синдрома при врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных с различной массой тела.

Чувствительность, отражающая долю положительных результатов, идентифицирована как наличие геморрагического синдрома и равна 92,9 %. Специфичность, отражающая долю отрицательных результатов, идентифицирована как отсутствие данного синдрома и составляет 41,8 % с площадью под ROC-кривой (AUC), равной $0,69 \pm 0,039$ (0,62–0,76), $p < 0,001$.

Основополагающим в патогенезе геморрагических расстройств у недоношенных младенцев с врожденной пневмонией является развитие ДВС-синдрома, что связано с образованием внутрисосудистых микросгустков, патологическим фибринолизом и кровоточивостью по причине дефицита гемостатических факторов. При наличии врожденной пневмонии ДВС-синдром всегда вторичен и является результатом целого ряда патологических состояний. Отсутствие геморрагического синдрома, или специфичность показателя ROC-кривой, зависит не только от гемостазиологических данных, но и от результативности использования высокотехнологичного оборудования и современных методов выхаживания. Мультифакторность механизмов воздействия на систему гемостаза с реализацией геморрагического синдрома (или чувствительность показателя ROC-кривой) сопровождается изменениями показателей свертывания крови, что позволяет разработать математическую модель для определения вероятности развития геморрагических нарушений у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией [11–14].

Для удобства определения вероятности развития геморрагического синдрома при врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных можно воспользоваться разработанной авторами компьютерной программой для практикующего врача, представленной на сайтах: <http://pneu.bsmu.by>; <https://www.bsmu.by> в меню Врач/Провизор: «Диагностика врожденной пневмонии».

Заключение. С помощью компьютерной программы сопровождения рассчитаны пороговые значения показателей: активированного частичного тромбопластинового времени – 0,366, коэффициента R – 0,208, протромбинового времени – 0,321, протромбинового индекса по Квику – 0,330,

международного нормализованного отношения – 0,242, тромбинового времени – 0,319, фибриногена – 0,295, D-димера – 0,448, тромбоцитов – 0,478, что позволяет отнести недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией и пороговым значением $\geq 0,293$ к группе риска по развитию геморрагического синдрома.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № М17-002, 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 Fundamental Research No. M17-002, the deadline date 18.04.2017–31.03.2019.

Список использованных источников

1. Intraventricular hemorrhage: risk factors and association with patent ductus arteriosus treatment in extremely preterm neonates / I. Khanfer-Larocque [et al.] // *Front. Pediatr.* – 2019. – Vol. 7. – Art. 408. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00408>
2. Ballabh, P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease / P. Ballabh // *Pediatr. Res.* – 2010. – Vol. 67, N 1. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3181c1b176>
3. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
4. Петри, А. Наглядная медицинская статистика / А. Петри, К. Сэбин. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 216 с.
5. Горячко, А. Н. Особенности гемостаза у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией в неонатальном периоде / А. Н. Горячко, А. В. Сукало // *Здоровья дитини.* – 2020. – Т. 15, № 7. – С. 510–517.
6. Володин, Н. Н. Детские болезни. Т. 1. Неонатология / Н. Н. Володин ; под ред. Н. Н. Володиной, Ю. Г. Мухиной, А. И. Чубаровой. – М. : Династия, 2011. – 512 с.
7. Рооз, Р. Практические рекомендации : пер. с нем. / Р. Рооз, О. Генцель-Боровичени, Г. Прокитте ; пер. : Р. Вауэр, Г. А. Шишко. – М. : Мед. лит., 2011. – 592 с.
8. Дмитриев, В. В. Практические вопросы клинической коагулологии / В. В. Дмитриев. – Минск : Беларус. навука, 2017. – 278 с.
9. Зубовская, Е. Т. Клинико-лабораторные показатели (референтные интервалы): пособие для врачей / Е. Т. Зубовская. – Минск : БГУФК, 2019. – 125 с.
10. Леонова, Е. Ю. Особенности системы гемостаза у новорожденных детей / Е. Ю. Леонова // *Охрана материнства и детства.* – 2016. – № 2. – С. 76–81.
11. Зубовская, Е. Т. Система гемостаза. Теоретические основы и методы исследования / Е. Т. Зубовская. – Минск : БГУФК, 2009. – 289 с.
12. Олс, Р. Гематология, иммунология и инфекционные болезни : пер. с англ. / Р. Олс ; под ред. Р. Полина, А. Г. Румянцева. – М. : Логосфера, 2013. – 408 с.
13. Ipepa, H. J. Use of oral vitamin K for prevention of late vitamin K deficiency bleeding in neonates when injectable vitamin K is not available / H. J. Ipepa // *Ann. Pharmacother.* – 2012. – Vol. 46, N 6. – P. 879–883. <https://doi.org/10.1345/aph.1q769>
14. Кузьменко, Г. Н. Состояние гемостаза у недоношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом / Г. Н. Кузьменко, С. Б. Назаров, В. В. Чемоданов. – Иваново : Иванов. изд. дом, 2016. – 300 с.

References

1. Khanfer-Larocque I., Soraisham A., Stritzke A., Awad E., Thomas S., Murthy P., Kamaluddeen M., Scott J. N., Mohammad K. Intraventricular hemorrhage: risk factors and association with patent ductus arteriosus treatment in extremely preterm neonates. *Frontiers in Pediatrics*, 2019, vol. 7, art. 408. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00408>
2. Ballabh P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease. *Pediatric Research*, 2010, vol. 67, no. 1, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181c1b176>
3. Rebrova O. Y. *Statistical analysis of medical data. Using the STATISTICA Application Package*. Moscow, MediaSfera Publ., 2002. 312 p. (in Russian).
4. Petri A., Sabin C. *Medical Statistics at a Glance. 3rd ed.* Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2015. 216 p. (in Russian).
5. Goryachko A. N., Sukalo A. V. Features of hemostasis in premature newborns with congenital pneumonia in the neonatal period. *Zdorov'ya diti* [Children health], 2020, vol. 15, no. 7, pp. 510–517 (in Russian).
6. Volodin N. N. *Children's diseases. Vol. 1. Neonatology*. Moscow, Dinastiya Publ., 2011. 512 p. (in Russian).
7. Rooz R., Gentsel'-Borovicheni O., Prokitt G. *Practical recommendations*. Moscow, Meditsinskaya literatura Publ., 2011. 592 p. (in Russian).
8. Dmitriev V. V. *Practical questions of clinical coagulology*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2017. 278 p. (in Russian).
9. Zubovskaya E. T. *Clinical and laboratory indicators (reference intervals): a guide for doctors*. Minsk, Belarusian State University of Physical Education, 2009. 289 p. (in Russian).
10. Leonova E. Yu. Features of the hemostasis system in newborns. *Okhrana materinstva i detstva* [Protection of mothers and children], 2016, no. 2, pp. 76–81 (in Russian).

11. Zubovskaya E. T. *System of hemostasis. Theoretical foundations and research methods*. Minsk, Belarusian State University of Physical Education, 2009. 289 p. (in Russian).

12. Ols R. *Hematology, immunology and infectious disease: neonatology questions and controversies*. Moscow, Logosfera Publ., 2013. 408 p. (in Russian).

13. Ipeма H. J. Use of oral vitamin K for prevention of late vitamin K deficiency bleeding in neonates when injectable vitamin K is not available. *Annals of Pharmacotherapy*, 2012, vol. 46, no. 6, pp. 879–883. <https://doi.org/10.1345/aph.1q769>

14. Kuz'menko G. N., Nazarov S. B., Chemodanov V. V. *The state of hemostasis in premature newborns with respiratory distress syndrome*. Ivanovo, Ivanovskii izdatel'skii dom Publ., 2016. 300 p. (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)
 УДК 616-006.6:577.121
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-91-102>

Поступила в редакцию 27.04.2021
 Received 27.04.2021

**А. Д. Таганович¹, Н. Н. Ковганко¹, В. И. Прохорова², Д. И. Мурашко¹,
 А. В. Колб¹, О. В. Готько², В. А. Матусевич²**

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
 им. Н. Н. Александрова, аг. Лесной, Минская область, Республика Беларусь

ОБОСНОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ CYFRA 21-1 И РЕЦЕПТОРОВ CXCR1, CXCR2, CD44v6 В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ СТАДИЯМИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ

Аннотация. Известно, что пятилетний барьер выживаемости преодолевают только 60–70 % пациентов с I стадией немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), а при II стадии она уже снижается до 35–40 %. Причиной столь высокой смертности практически всегда является рецидив заболевания, обусловленный наличием у этой категории пациентов скрытых метастазов, что свидетельствует о разном течении этого заболевания в пределах одной стадии. В связи с этим возникла необходимость в разработке прогностических показателей, которые бы позволяли предсказывать прогрессирование опухолевого процесса у пациентов на ранних стадиях развития опухоли с тем, чтобы правильно выстраивать стратегию и тактику их лечения.

Цель исследования – разработать лабораторные показатели, которые характеризуют уровень белков крови – участников канцерогенеза в прогнозе прогрессирования НМКРЛ у пациентов с ранними стадиями этого заболевания, и обосновать возможность их использования.

У 1250 пациентов (839 мужчин и 411 женщины), у которых впервые был диагностирован НМКРЛ в ранних стадиях (I и II), анализировалась длительность безрецидивного периода после проведенного лечения по результатам наблюдения в течение одного года. У 103 пациентов (возраст $56 \pm 22,5$ года) определяли уровень CYFRA 21-1, SCC, TPA, M2 пируваткиназы, хемокинов CXCL5, CXCL8, концентрацию HIF1 α и гиалуроновой кислоты иммуноферментным методом, уровень рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44v6 – методом проточной цитометрии. У 62 пациентов была I стадия (G1 – у 20, G2 – у 23, G3 – у 19), у 41 – II стадия (G1 – у 14, G2 – у 15, G3 – у 12).

По итогам одногодичного наблюдения и графического анализа (метод Каплана–Майера) определены группы низкого (I ст., G1-2 + II ст., G1) и высокого (I ст., G3 + II ст., G2-3) риска прогрессирования опухоли. У пациентов с высоким риском по сравнению с низким больше были уровень CYFRA 21-1, интенсивность флуоресценции (MFI) рецептора CXCR1 в гранулоцитах, относительное содержание рецептора CXCR2 в лимфоцитах и рецептора CD44v6 в моноцитах ($p < 0,05$). С их участием по результатам логистического регрессионного анализа построено уравнение, расчет которого позволяет прогнозировать риск рецидива опухоли. Пороговое значение уравнения – 0,467, чувствительность модели построения прогноза – 84,8 %, специфичность – 84,2 %, прогностическая ценность положительного результата – 81,2 %, отрицательного – 87,3 %.

Результаты проведенного исследования дают основание рекомендовать комплекс лабораторных показателей, включающий уровень CYFRA 21-1 и параметры рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44V6, для определения в крови пациентов с НМКРЛ на ранних стадиях заболевания с целью оценки у них риска прогрессирования опухоли.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, CYFRA 21-1, CXCR1, CXCR2, CD44v6, безрецидивная выживаемость

Для цитирования: Обоснование комплексного определения уровня CYFRA 21-1 и рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44v6 в крови пациентов с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого для прогнозирования риска опухолевой прогрессии / А. Д. Таганович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. наук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 91–102. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-91-102>

**Anatoli D. Tahanovich¹, Nikolai N. Kauhanka¹, Violetta I. Prohorova², Darja I. Murashko¹,
 Alexandr V. Kolb¹, Oksana V. Gotko², Victor A. Matusevich²**

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus

RATIONALE IMPORTANCE OF INTEGRATED DETERMINATION OF THE LEVEL OF CYFRA 21-1 AND THE RECEPTORS CXCR1, CXCR2, CD44v6 IN BLOOD OF PATIENTS WITH EARLY-STAGE NON-SMALL CELL LUNG CANCER FOR PREDICTING THE TUMOR PROGRESSION RISK

Abstract. Only 60–70 % patients with stage I and 35–40 % with stage II of non-small cell lung cancer (NSCLC) overcome the 5-year survival. The reason for such a high mortality rate is almost always a disease recurrence due to the presence of hid-

den metastases. This indicates a different course of the disease within one stage. There is a need to develop indicators that would allow predicting the tumor progression in patients at the early tumor development stages in order to correctly build the strategy and tactics of their treatment.

The objective of the study is to find and substantiate the possibility of using the laboratory parameters characterizing the level of blood proteins involved in carcinogenesis when predicting the NSCLC progression in patients with early disease stages.

In 1250 patients (839 men and 411 women) who were first diagnosed with NSCLC in the early stages (I and II), the duration of the recurrence-free period after treatment was analyzed according to the one-year observation results. In 103 patients (56 ± 22.5 years), the level of CYFRA 21-1, SCC, TPA, M2 of pyruvate kinase, chemokines CXCL5, CXCL8 and the concentration of HIF1 α and hyaluronic acid in blood serum were determined by the enzyme immunoassay and that of the receptors CXCR1, CXCR2, CD44v6 in blood granulocytes, lymphocytes and monocytes – by flow cytometry. 62 persons had stage I (G1 – 20, G2 – 23, G3 – 19) and 41 – stage II (G1 – 14, G2 – 15 and G3 – 12).

Based on the results of the one-year observation and the graphic analysis of Kaplan–Meier, the groups of low (stage I, G1-2 + stage II, G1) and high (stage I, G3 + stage II, G2-3) risk of tumor progression were identified. In high-risk patients, compared with low-risk patients, the level of CYFRA 21-1, the fluorescence intensity of the receptor CXCR1 in granulocytes, the relative content of the receptor CXCR2 in lymphocytes and the receptor CD44v6 in monocytes were higher ($p < 0.05$). With their participation, according to the results of logistic regression analysis, an equation was constructed, the calculation of which allows predicting the risk of tumor recurrence. The threshold for the equation is 0.467. The sensitivity of the forecasting model is 84.8 %, the specificity is 84.2 %, the predictive values of positive and negative results are 81.2 and 87.3 % respectively.

The study results showed that a set of laboratory parameters, including blood CYFRA 21-1 level in combination with CXCR1, CXCR2, CD44v6 can be used in patients with early stages of NSCLC to assess the risk of tumor progression.

Keywords: non-small cell lung cancer, CYFRA 21-1, CXCR1, CXCR2, CD44v6, recurrence-free survival

For citation: Tahanovich A. D., Kauhanka N. N., Prohorova V. I., Murashko D. I., Kolb A. V., Gotko O. V., Matusevich V. A. Rationale importance of integrated determination of the level of CYFRA 21-1 and the receptors CXCR1, CXCR2, CD44v6 in the blood of patients with early-stage non-small cell lung cancer for predicting the tumor progression risk. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 91–102 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-91-102>

Введение. Ежегодно в мире регистрируется 1,8 млн случаев заболевания раком легкого. В структуре смертности от рака у мужчин он стал ведущей причиной, а у женщин занял второе место [1]. В структуре заболеваемости раком легкого около 80 % составляет немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), который на основании гистологического исследования чаще всего является аденокарциномой или плоскоклеточным раком. Пятилетняя выживаемость пациентов с НМКРЛ существенно меньше, чем при злокачественных опухолях другой локализации (толстый кишечник, молочная железа, предстательная железа), и составляет 15 % [2]. Это обусловлено диагностикой этого заболевания на поздних стадиях. У 70 % пациентов удается поставить правильный диагноз только на III/IV стадии, когда оперативное вмешательство уже не показано или гораздо менее эффективно, и только у 16 % пациентов диагностируется НМКРЛ, ограниченный легочной тканью [3].

Самым ранним этапом клинически верифицированного развития опухоли, согласно классификации TNM, является I стадия. Как правило, таким пациентам после проведенной хирургической полной резекции опухоли никакого терапевтического лечения не проводят. Между тем еще в 2005 г. в результате предпринятого мета-анализа исследователи пришли к заключению, что адьювантная химиотерапия эффективна у пациентов с I стадией НМКРЛ [4]. Однако до настоящего времени нет понимания, в каких случаях на этом этапе развития заболевания проведение такой терапии является необходимым.

Полученные сведения дополняют имеющуюся информацию о том, что у пациентов с I стадией НМКРЛ 5-летний барьер выживаемости преодолевают только 60–70 %, а при II стадии она уже снижается до 35–40 %. Причиной столь высокой смертности практически всегда является рецидив заболевания, обусловленный наличием у этой категории скрытых метастазов, даже несмотря на постановку диагноза в ранней стадии, что свидетельствует о разном течении этого заболевания в пределах одной стадии. Таким образом, существует необходимость в разработке прогнозных показателей, которые бы позволяли предсказывать прогрессирование опухолевого процесса у пациентов на ранних стадиях развития опухоли с тем, чтобы правильно выстраивать стратегию и тактику их лечения.

Основными критериями течения НМКРЛ обычно служат стадия, возраст и состояние пациента. Вместе с тем многие исследователи отмечают, что в начале заболевания эти критерии малоэффективны и необходимо использовать другие клинические параметры, позволяющие судить о прогрессировании опухоли и исходе заболевания [5, 6]. Полагают, что оптимальным прогности-

ческим критерием могла бы быть комбинация нескольких легко и точно измеряемых показателей, характеризующих опухоль и состояние пациента. Обязательным требованием является чувствительность их к изменениям, происходящим в организме, что важно для повторного измерения [7].

Наименее инвазивным и наиболее доступным материалом для определения таких биомаркеров является кровь. С развитием технологий протеомики в качестве диагностических и прогнозных показателей злокачественного роста, в том числе у пациентов с НМКРЛ, предлагались различные белки, циркулирующие в кровотоке [8, 9]. Они являлись или компонентами опухолевых клеток, или участниками звеньев молекулярных событий развития опухолевой ткани. К ним, в частности, относятся ставшие уже классическими CYFRA 21-1 (фрагмент 19 цитокератина), SCC (антиген плоскоклеточного рака), СЕА (раковый эмбриональный антиген). Позже было показано, что СЕА и CYFRA 21-1 имеют не только диагностическое, но и прогностическое значение при НМКРЛ [10]. Однако результаты определения в сыворотке крови уровня каждого из них не смогли продемонстрировать необходимых специфичности и чувствительности [11].

С целью повышения диагностической и прогностической эффективности использования данных показателей при раке легкого были предприняты попытки создать мультианалитические панели из этих и некоторых других показателей метаболизма в опухолевой ткани. Тем не менее в настоящее время все еще нет информативного биомаркера или комбинации биомаркеров, которые позволили бы предсказать прогрессирование рака легкого после постановки диагноза на начальных стадиях этого заболевания и до начала лечения.

Воспаление относится к обязательному компоненту молекулярных событий, сопутствующих развитию рака [12]. CXCL5 и CXCL8, известный также как интерлейкин 8 (ИЛ-8), являются провоспалительными хемокинами. Взаимодействуя со своими рецепторами (CXCR1 и CXCR2) на поверхности клеток, они вызывают направленное перемещение и дегрануляцию нейтрофильных лейкоцитов в микроокружении опухоли, способствуя ангиогенезу и метастазированию [13]. Результаты ранее проведенных нами исследований позволили продемонстрировать изменение уровня этих белков в крови пациентов с НМКРЛ. Установлена связь данных маркеров с характеристиками опухолевого процесса, рассчитана диагностическая эффективность их определения при этом заболевании, которая в ряде случаев превысила таковую для классических маркеров [14].

Цель настоящего исследования – разработать лабораторные показатели, которые характеризуют уровень белков крови – участников канцерогенеза в прогнозе прогрессирования НМКРЛ у пациентов с ранними стадиями этого заболевания, и обосновать возможность их использования.

Объекты и методы исследования. Для обоснования групп риска прогрессирования опухоли у пациентов с ранними стадиями НМКРЛ вначале было предпринято ретроспективное исследование, в котором использовалась информация из базы данных Белорусского канцер-регистра. У 1250 пациентов (839 мужчин и 411 женщин), у которых в период с 01.01.2015 по 31.12.2015 впервые был диагностирован НМКРЛ на ранних стадиях (I и II), анализировалась длительность безрецидивного периода после проведенного лечения по результатам наблюдения в течение одного года. Средний возраст пациентов составил $57 \pm 24,5$ года. Стадия I была у 732 человек (493 мужчин и 239 женщин), стадия II – у 518 человек (361 мужчины и 157 женщин).

Исследование уровня хемокинов и их рецепторов проводили у 103 пациентов (72 мужчин и 31 женщины), поступивших в стационар ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» в период с 01.01.2019 по 31.12.2020 гг., у которых впервые диагностирован НМКРЛ I или II стадии. Средний возраст пациентов составил $56 \pm 22,5$ года. Стадия I была диагностирована у 62 человек (42 мужчин и 20 женщин). По результатам гистологического исследования высокодифференцированная опухоль (G1) была у 20 человек, средней степени дифференцировки (G2) – у 23, низкодифференцированная (G3) – у 19. У 41 пациента (30 мужчин и 11 женщин) была выявлена II стадия. Из них по степени злокачественности опухоли G1 была у 14 человек, G2 – у 15, G3 – у 12.

Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Кровь из локтевой вены собирали натошак в вакутайнер с ЭДТА-K2. Концентрацию антигена CYFRA 21-1 (фрагмент цитокератина-19) и биомаркера плоскоклеточного рака SCC (подфрак-

ция ингибитора сериновой протеазы ТА-4) в сыворотке крови определяли на автоматическом анализаторе Cobas e411 (Rosche Diagnostics GmbH, Германия), использующем принцип электрохемилюминесценции.

Концентрацию хемокинов CXCL5 и CXCL8, индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 α , а также изофермента пируваткиназы TuM2 PK и гиалуриновой кислоты в сыворотке крови пациентов с НМКРЛ определяли с помощью ИФА-наборов FineTest (КНР) на автоматическом ИФА-анализаторе Brio (Seac, Италия), оптическую плотность ИФА-наборов измеряли с помощью планшетного фотометра Sirio (Seac, Италия) при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм.

Концентрацию рецепторов CXCR1, CXCR2 и CD44v6 в клетках лейкоцитарного ряда и плотность их расположения в мембране клетки определяли, используя проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, США). В пробирку помещали 100 мкл крови, стабилизированной ЭДТА-К2 в качестве антикоагулянта, и смеси растворов соответствующих антител (по 5 мкл), содержащих флуоресцентные метки: CD44v6-FITC (Invitrogen, США), CD181(CXCR1)-PE-Cy5 (BioLegend, США), CD182(CXCR2)-PE (BioLegend, США) и CD45-Pacific Orange (Exbio, Чехия). Через 15 мин инкубации в темноте с антителами, содержащими флуоресцентную метку, к смеси добавляли 1 мл лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, Франция). Фиксацию антител на поверхности клеток осуществляли с помощью раствора IQTest 3 (Beckman Coulter, Франция).

Для выяснения зависимости длительности безрецидивного периода от времени наблюдения строили графики Каплана–Майера. Сравнение групп с различным риском прогрессирования НМКРЛ проводили, используя log-rank тест и χ^2 .

Построение диагностической модели осуществляли с помощью метода бинарной логистической регрессии. Использовали метод пошагового включения предикторов, который ранжирует признаки в соответствии с их вкладом в модель. Относительный вклад отдельных предикторов выражали с помощью стандартизованного коэффициента регрессии. Качество приближения регрессионной модели оценивали, используя функцию правдоподобия, мерой которой служит отрицательное удвоенное значение логарифма этой функции ($-2LL$). Согласованность полученной модели (регрессионного уравнения) проверяли, используя тест Хосмера–Лемешева.

Оценку интегральной диагностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью метода построения характеристических ROC-кривых с последующим вычислением площади под ROC-кривой (AUC). О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета чувствительности, специфичности, предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов и диагностической эффективности теста. Для этого использовали расчетные значения истинноположительных, истинноотрицательных, ложноположительных и ложноотрицательных результатов диагностического теста. Расчет производили по общепринятым формулам. Пороговое значение определяли как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности теста при построении кривых зависимости чувствительности от вероятности ложноположительных результатов.

При всех видах статистического анализа критическим считали уровень значимости при $p = 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Необходимость проведения ретроспективного исследования была продиктована поиском и выделением групп риска прогрессирования опухоли в ранних стадиях НМКРЛ. С этой целью в расчет принимали только те факторы, которые связаны с развитием опухоли и могут оказывать влияние на прогрессирование заболевания в первую очередь. По мнению различных авторов, к ним относятся стадия заболевания и степень дифференцировки клеток опухоли, или Grade [15]. Однако обоснования этим предложениям при НМКРЛ не было сделано. Поэтому в настоящей работе мы проанализировали вышеназванные факторы, сопоставив их с результатами одногодичного наблюдения после проведенного лечения до наступления рецидива заболевания.

Результаты графического анализа Каплана–Майера позволили оценить зависимость безрецидивной выживаемости пациентов от стадии НМКРЛ и степени дифференцированности опухоли. Как и ожидалось, длительность безрецидивной выживаемости пациентов с II стадией НМКРЛ была значительно ниже, чем пациентов с I стадией заболевания (рис. 1). Аналогичным образом наблюдались четкие различия в безрецидивной выживаемости пациентов с разной сте-

пенью дифференцировки опухолевых клеток (рис. 2). В объединенной группе пациентов с I и II стадиями наиболее высокой она была, когда клетки опухоли были высокодифференцированы (G1), а затем, по мере снижения степени дифференцировки (G2, G3), она неуклонно уменьшалась.

График Каплана–Майера, в котором приведена безрецидивная выживаемость пациентов одновременно в зависимости от стадии (I или II) и степени дифференцировки опухолевых клеток, наглядно демонстрирует разделение кривых на две группы. Первая включала пациентов с более

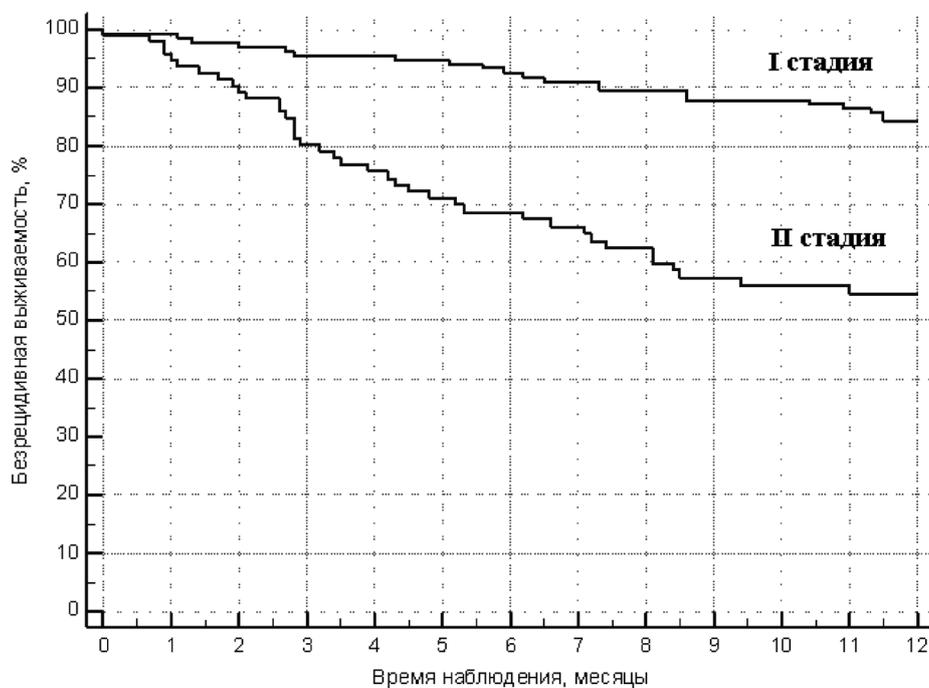


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость пациентов с I или II стадией НМКРЛ

Fig. 1. Disease-free survival of patients with stage I or II NSCLC

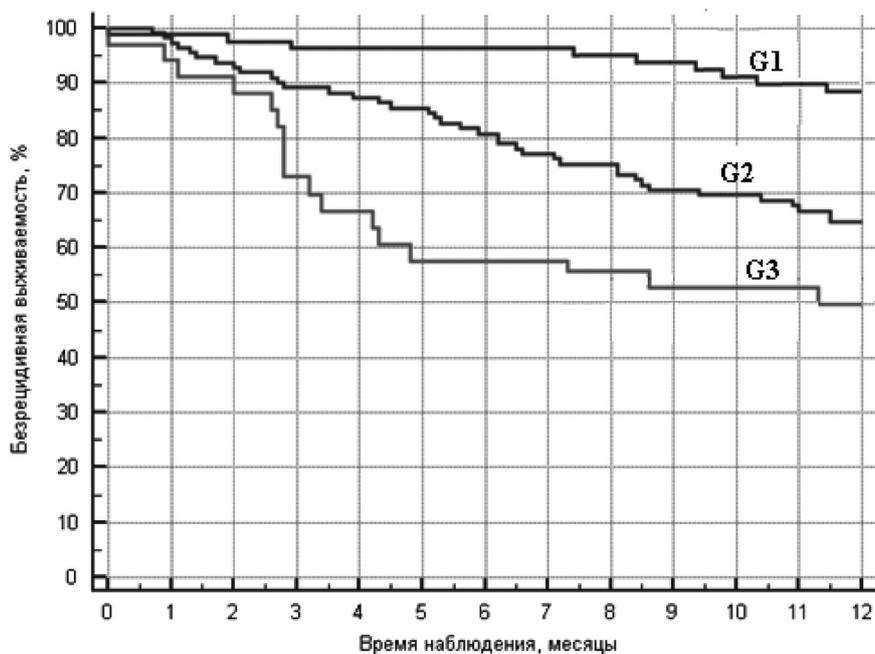


Рис. 2. Безрецидивная выживаемость пациентов с ранними стадиями НМКРЛ (I + II ст.) в зависимости от степени дифференцировки раковых клеток (G1, G2, G3)

Fig. 2. Disease-free survival of patients with early NSCLC stages (I + II grade) depending on the differentiation degree of cancer cells (G1, G2, G3)

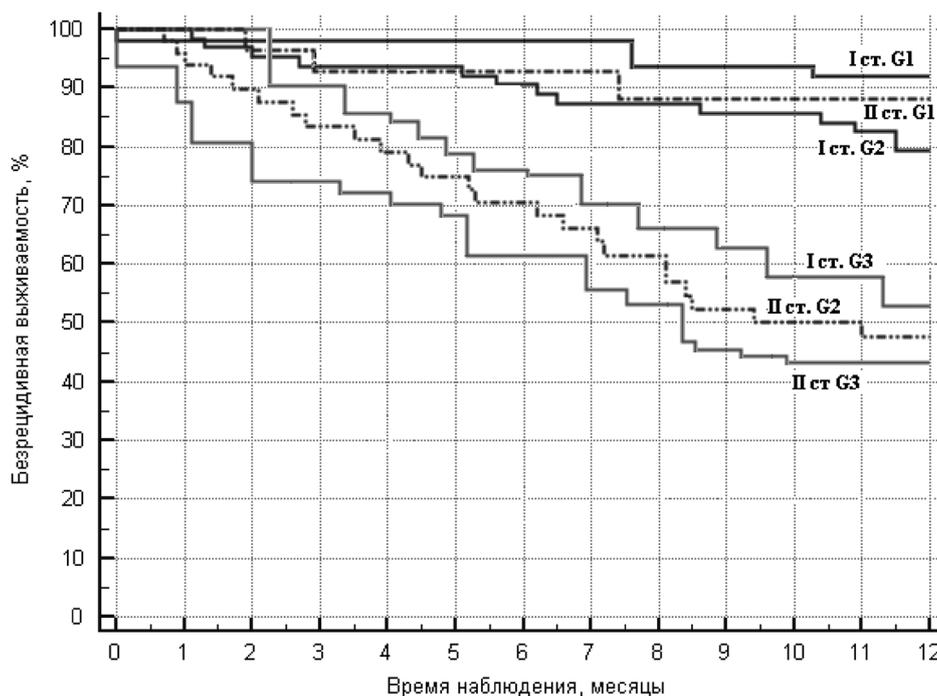


Рис. 3. Безрецидивная выживаемость пациентов с НМКРЛ в зависимости от стадии и степени дифференцировки раковых клеток

Fig. 3. Disease-free survival of NSCLC patients depending on the stage and differentiation degree of cancer cells

длительной безрецидивной выживаемостью (пациенты с I стадией НМКРЛ и высокодифференцированной опухолью (G1) или опухолью средней степени дифференцировки (G2), а также пациенты с II стадией заболевания и высокодифференцированной опухолью), вторая – пациентов с более коротким периодом безрецидивной выживаемости (пациенты с I стадией и низкодифференцированной опухолью (G3) и пациенты с II стадией, у которых опухолевые клетки были средней степени дифференцировки или низкодифференцированными) (рис. 3).

На основании полученных данных все пациенты были разделены на группы быстрого (I ст., G1-2 + II ст., G1) и медленного (I ст., G3 + II ст., G2-3) прогрессирования опухоли или, соответственно, высокого и низкого риска прогрессирования. Результаты построения графика Каплана–Майера показывают, что различия в безрецидивной выживаемости между этими двумя группами превышают различия в выживаемости в зависимости только от стадии НМКРЛ или только от степени дифференцированности опухолевых клеток (рис. 4).

Еще более отчетливо различия в выживаемости пациентов исследуемых групп прослеживаются по результатам проведения log-rank теста с использованием критерия χ^2 при сравнении показателей только в зависимости от стадии НМКРЛ или только от степени злокачественности (см. табл. 1). Его величина была статистически значимой и, характеризуя выраженность различий в группах быстрого (высокий риск) и медленного (низкий риск) прогрессирования опухоли, у пациентов с I ст., G1-2 + II ст., G1 против пациентов с I ст., G3 + II ст., G2-3 превышала значения этого показателя в 3 раза, если в расчет принималась только стадия заболевания, и в 1,5 раза, если анализировалась зависимость только от степени злокачественности (табл. 1).

Таким образом, были получены веские аргументы для того, чтобы дальнейший анализ проводить в группах медленного и быстрого прогрессирования опухоли, в которые вошли пациенты с I ст., G1-2 + II ст., G1 и с I ст., G3 + II ст., G2-3 соответственно.

Из 26 определяемых лабораторных параметров крови, в которые вошли те, для которых связь с выраженностью заболевания и дескрипторов опухоли была известна давно (CYFRA 21-1, SCC, пируваткиназа M2), и те, для которых такая связь была установлена совсем недавно (CXCR1, CXCR2, CXCL5, CXCL8, CD44v6, HIF-1 α), уровень только четырех из них демонстрирует существенную разницу между группами высокого и низкого риска прогрессирования опухоли (табл. 2).

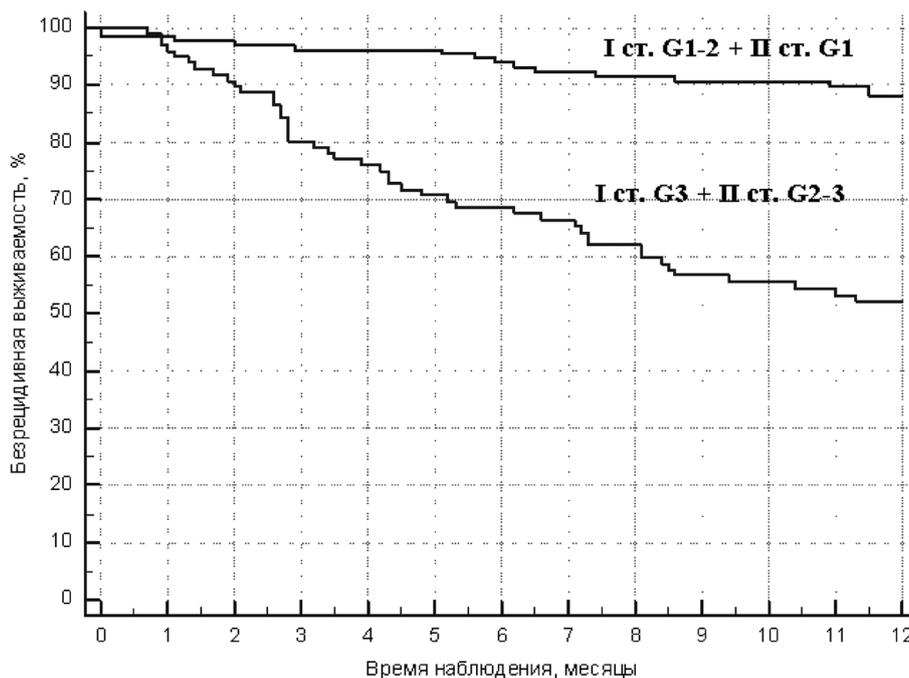


Рис. 4. Безрецидивная выживаемость пациентов с НМКРЛ в зависимости от комбинированного сочетания стадии и степени дифференцированности опухоли

Fig. 4. Disease-free survival of NSCLC patients depending on a combined combination of the stage and the differentiation degree of the tumor

Таблица 1. Значения статистических показателей для различных групп риска (log-rank test)

Table 1. Values of log-rank test for different risk groups

Группа пациентов / Статистический показатель	I/II ст.	G1/G2/G3	I ст. G1-2 + II ст. G1 / I ст. G3 + II ст. G2-3
χ^2	24,19	41,46	66,15
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Таблица 2. Уровень рецепторов, лигандов и опухолевых биомаркеров у пациентов с низким и высоким риском прогрессирования опухоли

Table 2. Level of receptors, ligands, and tumor biomarkers in patients with low and high risk of tumor progression

Показатель	Низкий риск	Высокий риск	p
CXCR1:			
гранулоциты:			
%	95,10 [93,80; 96,50]	95,90 [92,90; 95,80]	0,542
MFI	37,40 [27,90; 43,55]	50,60 [34,60; 60,00]	0,027
лимфоциты:			
%	9,00 [5,10; 18,00]	12,30 [6,40; 18,00]	0,513
MFI	2,70 [2,30; 3,90]	3,50 [2,60; 12,90]	0,416
моноциты:			
%	85,40 [72,10; 96,30]	94,80 [75,80; 96,80]	0,542
MFI	2,80 [2,40; 3,70]	3,30 [2,90; 26,90]	0,710
CXCL8, пг/мл	163,65 [80,02; 283,38]	172,73 [70,09; 39,71]	0,667
CXCR2:			
гранулоциты:			
%	94,80 [92,60; 95,80]	95,00 [90,00; 96,80]	0,977
MFI	102,80 [88,60; 120,20]	106,60 [84,50; 128,00]	0,797

Показатель	Низкий риск	Высокий риск	<i>p</i>
лимфоциты:			
%	14,80 [11,05; 20,70]	19,30 [14,90; 24,90]	0,031
MFI	14,20 [12,20; 18,70]	14,80 [11,80; 18,60]	1,000
моноциты:			
%	92,50 [79,90; 97,60]	97,40 [87,90; 98,20]	0,139
MFI	21,50 [15,70; 26,80]	25,60 [18,60; 58,80]	0,374
CXCL5, пг/мл	457,11 [133,56; 805,18]	529,61 [286,94; 1027,73]	0,078
CD44v6:			
гранулоциты:			
%	3,35 [2,00; 5,25]	4,15 [2,30; 6,10]	0,973
MFI	2,50 [2,10; 2,70]	2,70 [2,10; 3,45]	0,308
лимфоциты:			
%	1,05 [0,50; 2,00]	1,20 [0,55; 1,55]	0,769
MFI	2,20 [1,90; 3,90]	3,65 [2,55; 4,60]	0,375
моноциты:			
%	3,20 [1,35; 4,00]	5,10 [3,50; 6,80]	0,043
MFI	4,90 [2,20; 6,00]	5,20 [4,15; 8,05]	0,451
HIF-1α, пг/мл	2,68 [2,30; 3,48]	2,86 [2,12; 3,70]	0,808
Гиалуроновая кислота, нг/мл	21,40 [12,70; 26,00]	25,30 [16,40; 37,50]	0,058
CYFRA 21-1, нг/мл	2,44 [1,56; 4,03]	3,08 [2,21; 5,43]	0,041
SCC, нг/мл	1,53 [1,10; 2,48]	1,63 [1,17; 2,38]	0,668
TPA, пг/мл	830,78 [657,10; 1179,96]	929,30 [773,80; 1205,36]	0,138
TuM2 PK, пг/мл	1866,55 [1289,49; 2627,38]	2169,64 [1733,49; 3193,60]	0,106

Примечание. CXCR1, CXCR2, CD44v6 (лимфоциты, моноциты, гранулоциты): % – доля соответствующих клеток среди клеток того же типа, несущих на своей поверхности соответствующий вид рецептора; MFI – интенсивность флуоресценции комплексов антитело/рецептор, пропорциональная количеству рецепторов на одной соответствующей клетке; *p* – уровень статистической значимости между определяемым показателем у группы с низким риском прогрессирования опухоли в сравнении с группой с высоким риском прогрессирования.

Статистически достоверно более высокими у пациентов с НМКРЛ и высоким риском по сравнению с низким риском были уровень CYFRA 21-1, интенсивность флуоресценции (MFI) рецептора CXCR1 в гранулоцитах, относительное содержание рецептора CXCR2 в лимфоцитах и рецептора CD44v6 в моноцитах. Поэтому все они были вовлечены в построение модели определения риска опухолевой прогрессии методом логистической регрессии. В результате составлено уравнение логистической регрессии для предсказания развития опухолевой прогрессии у пациентов с НМКРЛ, которое учитывает все четыре отобранных параметра крови:

$$Y = \exp(-0,728 + 0,401X_1 + 0,153X_2 + 0,811X_3 + 0,673X_4) / (1 + \exp(-0,728 + 0,401X_1 + 0,153X_2 + 0,811X_3 + 0,673X_4)),$$

где X_1 – результат определения концентрации антигена Cyfra 21-1 в сыворотке крови; X_2 – интенсивность флуоресценции рецептора CXCR1 в гранулоцитах; X_3 – относительное количество рецептора CXCR2 в лимфоцитах, %; X_4 – относительное количество рецептора CD44v6 в моноцитах; Y – результат регрессионного уравнения; числа перед значениями X_1 – X_4 – коэффициенты логистической регрессии; \exp ($\approx 2,718$) – основание натурального логарифма; «– 0,728» – константа логистического уравнения.

В дальнейшем было проанализировано качество созданной модели. Оказалось, что все отобранные показатели вносили существенный вклад в логистическое уравнение. Это следует из того обстоятельства, что включение их в уравнение приводит к существенному снижению отрицательного удвоенного значения логарифма функции правдоподобия ($\Delta = 20,9$, $p < 0,05$) и соответствует хорошему качеству предложенной модели. Об этом же свидетельствует рассчитанный критерий согласия Хосмера–Лемешева, равный 9,15 ($p = 0,431$). Таким образом, поскольку в данном случае уровень статистической значимости $p > 0,05$, подтверждается согласованность данных регрессионного уравнения при отнесении пациентов к низкому или высокому риску прогрессирования опухоли при НМКРЛ.

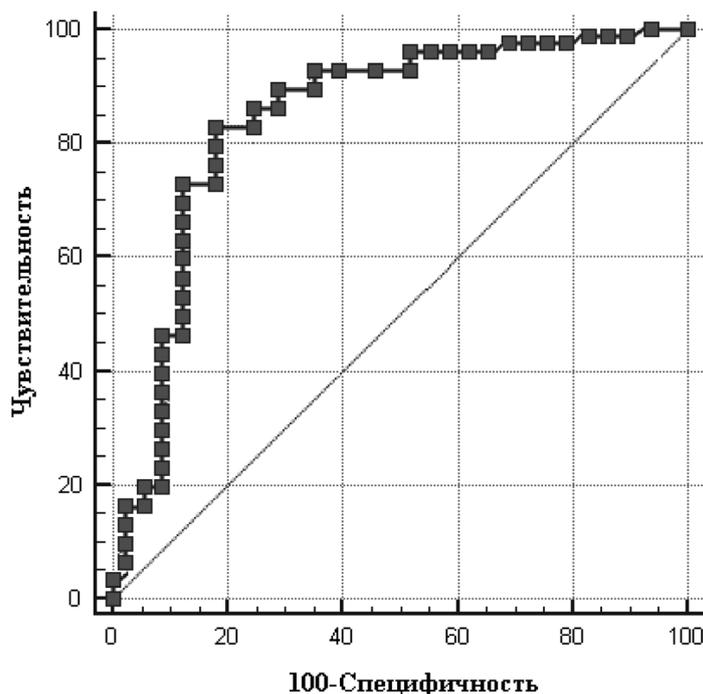


Рис. 5. ROC-кривая результатов уравнения логистической регрессии для оценки риска опухолевой прогрессии у пациентов с НМКРЛ на основании определения в крови уровня CYFRA 21-1 и рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44v6

Fig. 5. ROC-curve of the results of the logistic regression equation for assessing the risk of tumor progression in patients with NSCLC based on the determination of the level of CYFRA 21-1 and receptors CXCR1, CXCR2, CD44v6 in the blood

О надежности регрессионного уравнения, в котором используется комбинация из значений четырех указанных выше маркеров для прогнозирования риска опухолевой прогрессии, свидетельствуют результаты ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой, согласно экспертной шкале AUC, соответствует «очень хорошему» качеству прогностической модели (0,821). Оптимальное пороговое значение для разделения групп низкого и высокого риска развития опухолевой прогрессии составило 0,467 (табл. 3, рис. 5). То есть, если $Y > 0,467$, то в 81,2 % случаев у пациента действительно будет высокий риск рецидива опухоли, в то время как при $Y \leq 0,467$ у 87,3 % пациентов правильным будет прогноз низкого риска прогрессирования опухоли.

Диагностическая эффективность прогноза низкого или высокого риска развития рецидива опухоли в случае использования результатов логистического уравнения значительно выросли – до 84,5 % (чувствительность – 84,8 %, специфичность – 84,2 %). По сути, все эти показатели оказались гораздо выше, чем при использовании каждого из них в отдельности с аналогичной прогностической целью (табл. 3).

Таблица 3. Диагностическая значимость индивидуального и комбинированного определения в крови уровня параметров у пациентов с низким и высоким риском опухолевой прогрессии

Table 3. Diagnostic value of individual and combined determination in the blood of the level of parameters of patients with low and high risk of tumor progression

Показатель	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
CYFRA 21-1, $\times 10^{-6}$ г/л	>2,8	62,5	71,9	64,2	70,4	0,637	68,9
CXCR1 гранулоциты, MFI	>43,2	60,9	66,7	59,6	67,9	0,601	64,1
CXCR2 лимфоциты, %	>15,7	67,4	68,4	63,3	72,2	0,627	68,0
CD44v6 моноциты, %	>4,1	63,0	70,2	63,0	70,2	0,612	67,0
Комбинация (Y)	>0,467	84,8	84,2	81,2	87,3	0,821	84,5

Примечание. ПЗ – пороговое значение, ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата, ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата, AUC – площадь под ROC-кривой, ДЭ – диагностическая эффективность.

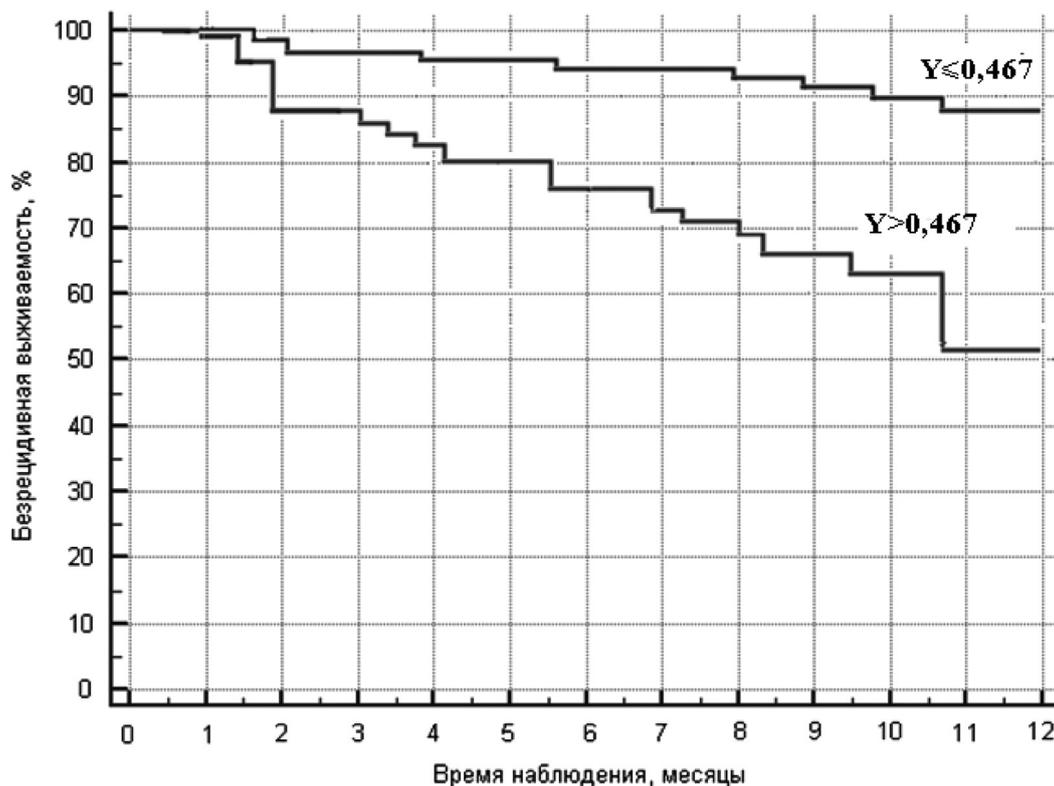


Рис. 6. Безрецидивная выживаемость пациентов с ранними стадиями НМКРЛ в зависимости от значений результата регрессионного уравнения Y

Fig. 6. Disease-free survival of patients with early stages of NSCLC depending on the values of the result of the regression equation Y

С целью проверки работоспособности предложенной регрессионной модели на основе полученного порогового значения $Y = 0,467$ был построен график Каплана–Майера однолетней безрецидивной выживаемости пациентов с ранними стадиями НМКРЛ (рис. 6).

Распределение вероятности безрецидивной выживаемости, по данным однолетнего наблюдения, соответствует результатам ретроспективного исследования (см. рис. 4). К концу первого года после проведенного лечения у пациентов с низким риском развития опухолевой прогрессии выживаемость составляет 88 % (ретроспективное исследование) и 87 % при вовлечении отобранных параметров крови в регрессионное уравнение, а у пациентов с высоким риском опухолевой прогрессии – 53 и 51 % соответственно.

Заключение. Результаты проведенного исследования дают основание рекомендовать комплекс лабораторных показателей, включающий уровень CYFRA 21-1 и параметры рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44v6, для определения в крови пациентов с НМКРЛ на ранних стадиях заболевания с целью оценки у них риска прогрессирования опухоли.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase № 11. International Agency for Research on Cancer. – Mode of access : <http://globocan.iarc.fr>. – Date of access : 09.01.2022.
2. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2008, National Cancer Institute / N. Howlader [et al.]. – Mode of access : http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008. – Date of access : 09.01.2022.
3. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016: Table 15.14 NonSmall Cell Cancer of the Lung and Bronchus (Invasive). National Cancer Institute / N. Howlader [et al.]. – Mode of access : https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2017/. – Date of access : 09.01.2022.
4. Meta-analysis of postoperative adjuvant chemotherapy with tegafururacil in non-small-cell lung cancer / C. Hamada [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2005. – Vol. 23, N 22. – P. 4999–5006. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.017>

5. NCCN non-small cell lung cancer clinical practice guidelines / D. S. Ettinger [et al.] // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2017. – Vol. 15, N 4. – P. 504–535. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0050>
6. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and CYFRA21-1 in patients with pathological stage I non-small cell lung cancer / K. Matsuoka [et al.] // *Eur. J. Cardiothoracic Surg.* – 2007. – Vol. 3, N 3. – P. 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2007.05.014>
7. McShane, L. M. Identification of clinically useful cancer prognostic factors: what are we missing? / L. M. McShane, D. G. Altman, W. Sauerbrei // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 2005. – Vol. 97, N 14. – P. 1023–1025. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji193>
8. Current and prospective protein biomarkers of lung cancer / T. N. Zamay [et al.] // *Cancers.* – 2017. – Vol. 9, N 11. – Art. 155. <https://doi.org/10.3390/cancers9110155>
9. Baseline C-reactive protein level predicts survival of early-stage lung cancer: evidence from a systematic review and meta-analysis / G. Leuzzi [et al.] // *Tumori.* – 2016. – Vol. 102, N 5. – P. 441–449. <https://doi.org/10.5301/tj.5000522>
10. CYFRA21-1 is a prognostic determinant in non-small cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients / J.-L. Pujol [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2004. – Vol. 90, N 11. – P. 2097–2105. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601851>
11. Serum biomarker profiles as diagnostic tools in lung cancer / B. M. Nolen [et al.] // *Cancer Biomarkers.* – 2011–2012. – Vol. 10, N 1. – P. 3–12. <https://doi.org/10.3233/CBM-2012-0229>
12. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability / F. Colotta [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2009. – Vol. 30, N 7. – P. 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
13. CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target / W. Zhang [et al.] // *Cancer Commun.* – 2020. – Vol. 40, N 2–3. – P. 69–80. <https://doi.org/10.1002/cac2.12010>
14. Хемокины CXCL5, CXCL8 и их рецепторы CXCR1, CXCR2 – потенциальные биомаркеры немелкоклеточного рака легкого // А. Д. Таганович [и др.] // *Лаб. диагностика. Восточная Европа.* – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 252–271.
15. Histological grade: analysis of prognosis of non-small cell lung cancer after complete resection / M. Yasukawa [et al.] // *In Vivo.* – 2018. – Vol. 32, N 6. – P. 1505–1512. <https://doi.org/10.21873/invivo.11407>

References

1. *GLOBOCAN 2020 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase No 11. International Agency for Research on Cancer.* Available at : <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf> (accessed 09.01.2022).
2. Howlander N., Noone A. M., Krapcho M., Neyman N., Aminou R., Waldron W. [et al.]. *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2008, National Cancer Institute.* Available at : http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008 (accessed 09.01.2022).
3. Howlander N., Noone A. M., Krapcho M., Miller D., Brest A., Yu M. [et al.]. *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016: Table 15.14 NonSmall Cell Cancer of the Lung and Bronchus (Invasive).* Available at : https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2017/ (accessed 09.01.2022).
4. Hamada C., Tanaka F., Ohta M., S. Fujimura, Kodama K., Imaizumi M., Wada H. [et al.]. Meta-analysis of postoperative adjuvant chemotherapy with tegafururacil in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, vol. 23, no. 22, pp. 4999–5006. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.017>
5. Ettinger D. S., Wood D. E., Aisner D. L., Akerley W., Bauman J., Chirieac L. R. [et al.]. NCCN Non-small cell lung cancer clinical practice guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2017, vol. 15, no. 4, pp. 504–535. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0050>
6. Matsuoka K., Sumitomo S., Nakashima N., Nakajima D., Misaki N. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and CYFRA21-1 in patients with pathological stage I non-small cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2007, vol. 3, no. 3, pp. 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2007.05.014>
7. McShane L. M., Altman D. G., Sauerbrei W. Identification of clinically useful cancer prognostic factors: what are we missing? *Journal of the National Cancer Institute*, 2005, vol. 97, no. 14, pp. 1023–1025. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji193>
8. Zamay T. N., Zamay G. S., Kolovskaya O. S., Zukov R. A., Petrova M. M., Gargaun A., Berezovski M. V., Kichkailo A. S. Current and prospective protein biomarkers of lung cancer. *Cancers*, 2017, vol. 9, no. 11, art. 155. <https://doi.org/10.3390/cancers9110155>
9. Leuzzi G., Galeone C., Gisabella M., Duranti L., Taverna F., Suatoni P., Morelli D., Pastorino U. Baseline C-reactive protein level predicts survival of early-stage lung cancer: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Tumori*, 2016, vol. 102, no. 5, pp. 441–449. <https://doi.org/10.5301/tj.5000522>
10. Pujol J.-L., Molinier O., Ebert W., Daurès J.-P., Barlesi F., Buccheri G. [et al.]. CYFRA21-1 is a prognostic determinant in non-small cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *British Journal of Cancer*, 2004, vol. 90, no. 11, pp. 2097–2105. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601851>
11. Nolen B. M., Langmead C. J., Choi S., Lomakin A., Marrangoni A., Bigbee W. L., Weissfeld J. L., Wilson D. O., Dacic S., Siegfried J. M., Lokshin A. E. Serum biomarker profiles as diagnostic tools in lung cancer. *Cancer Biomarkers*, 2011–2012, vol. 10, no. 1, pp. 3–12. <https://doi.org/10.3233/CBM-2012-0229>
12. Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 2009, vol. 30, no. 7, pp. 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
13. Zhang W., Wang H., Sun M., X. Deng, Wu X., Ma Y., Li M., Shuo S. M., You Q., Miao L. CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target. *Cancer Communications*, 2020, vol. 40, no. 2–3, pp. 69–80. <https://doi.org/10.1002/cac2.12010>

14. Taganovich A. D., Kovganko N. N., Prokhorova V. I., Got'ko O. V., Derzhavets L. A., Murashko D. I. Chemokines CXCL5, CXCL8 and their receptors CXCR1, CXCR2 – potential biomarkers of non-small cell lung cancer. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa* [Laboratory diagnostics. Eastern Europe], 2020, vol. 9, no. 3, pp. 252–271 (in Russian).

15. Yasukawa M., Sawabata N., Kawaguchi T., Kawai N., Nakai T., Ohbayashi C., Taniguchi S. Histological grade: analysis of prognosis of non-small cell lung cancer after complete resection. *In Vivo*, 2018, vol. 32, no. 6, pp. 1505–1512. <https://doi.org/10.21873/invivo.11407>

Информация об авторах

Таганович Анатолий Дмитриевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ataganovich@gmail.com

Ковганко Николай Николаевич – канд. хим. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mikalai44@tut.by

Прохорова Виолетта Игоревна – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, агр. Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: vprohorova@mail.ru

Мурашко Дарья Игоревна – аспирант. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: murashkodi@tut.by

Колб Александр Владимирович – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sanya.kolb@yandex.by

Готько Оксана Владимировна – ст. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, агр. Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: babuka_05@mail.ru

Матусевич Виктор Александрович – канд. биол. наук, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, агр. Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: vixan@tut.by

Information about the authors

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

Nikolai N. Kauhanka – Ph. D. (Chem.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mikalai44@tut.by

Violetta I. Prohorova – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: vprohorova@mail.ru

Darja I. Murashko – Postgraduate student. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: murashkodi@tut.by

Alexandr V. Kolb – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sanya.kolb@yandex.by

Oksana V. Gotko – Senior Researcher. N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: babuka_05@mail.ru

Victor A. Matusевич – Ph. D. (Biol.), Head of the Department. N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: vixan@tut.by

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.314.74, 616.314.72

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-103-111>

Поступила в редакцию 12.10.2021

Received 12.10.2021

А. А. Гушин¹, А. А. Адамчик¹, С. П. Рубникович², Е. С. Запорожская-Абрамова¹,
В. А. Иващенко¹, Ж. В. Соловьёва¹, В. В. Таиров¹, С. И. Рисованный¹, Ю. Л. Денисова²

¹Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ТЕРМОВИБРАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ПРОЧНОСТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В СТОМАТОЛОГИИ

Аннотация. Целью работы являлась оценка эффективности влияния термовибрационного воздействия на прочность на изгиб и твердость поверхности композитных пломбировочных материалов.

Исследование было проведено на базе кафедры терапевтической стоматологии Кубанского государственного медицинского университета, а также на Краснодарском приборном заводе «Каскад». Исследуемые образцы были изготовлены в соответствии с групповой принадлежностью из трех различных композитных материалов: Estelite Sigma Quick, Filtek Bulk Fill Posterior Restorative и «ДентЛайт». Оценка прочности на изгиб проводили на испытательной машине «МИП-10» фирмы «НПК «ТЕХМАШ»». Определение твердости поверхности по Виккерсу осуществляли на аппарате «ПМТ-3» фирмы «Ломо».

По результатам лабораторных исследований было определено статистически значимое увеличение показателей прочности на изгиб и твердости поверхности по Виккерсу всех образцов композитных материалов, подвергшихся термовибрационному воздействию перед полимеризацией.

Полученные данные свидетельствуют о повышении прочностных характеристик композитных пломбировочных материалов в результате термовибрационного воздействия перед их полимеризацией, что увеличивает срок службы композитных пломб и снижает риски образования вторичного кариеса после пломбирования.

Ключевые слова: термовибрационное воздействие, пломбировочный материал, композит, твердость поверхности, прочность на изгиб

Для цитирования: Влияние термовибрационного воздействия на прочностные характеристики композитных материалов, применяемых в стоматологии / А. А. Гушин [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 103–111. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-103-111>

Alexander A. Gushchin¹, Anatoly A. Adamchik¹, Sergey P. Rubnikovich², Ekaterina S. Zaporozhskaya-Abramova¹,
Victoriya A. Ivashchenko¹, Zhanna V. Solovyeva¹, Valery V. Tairov¹, Sergey I. Risovannyi¹, Yuliya L. Denisova²

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF THERMAL VIBRATION IMPACT ON THE STRENGTH CHARACTERISTICS OF COMPOSITE MATERIALS USED IN DENTISTRY

Abstract. The article discusses the evaluation of the effectiveness of the influence of thermal vibration effects on the bending strength and surface hardness of composite filling materials.

The study was conducted on the basis of the Department of Therapeutic Dentistry of the Kuban State Medical University, as well as at the Krasnodar Instrument Plant “Cascade”. The samples under study were made according to the group affiliation from three different composite materials: Estelite Sigma Quick, Filtek Bulk Fill Posterior Restorative and DentLight. The bending strength was evaluated on the “MIP-10” testing machine of the company “NPK TECHMASH”. Determination of the surface hardness according to Vickers was carried out on the device PMT-3 of the company “LOMO”.

According to laboratory studies, a statistically significant increase in flexural strength and surface hardness according to Vickers was determined for all samples of composite materials subjected to thermal vibration before polymerization.

The data obtained indicate an increase in the strength characteristics of composite filling materials as a result of thermal vibration exposure before their polymerization, which increases the service life of composite fillings and reduces the risks of secondary caries formation after filling.

Keywords: thermal vibration effect, filling material, composite, surface hardness, bending strength

For citation: Gushchin A. A., Adamchik A. A., Rubnikovich S. P., Zaporozhskaya-Abramova E. S., Ivashchenko V. A., Solovyeva Zh. V., Tairov V. V., Risovannyi S. I., Denisova Yu. L. Influence of thermal vibration impact on the strength characteristics of composite materials used in dentistry. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 103–111 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-103-111>

Введение. Существующая в настоящее время проблема образования вторичного кариеса в области композитных реставраций и твердых тканей зуба часто связана с нарушением краевого прилегания и прочности пломб [1–5]. Известны различные методы воздействия на композиты для улучшения качества композитных пломбировочных материалов, такие как предварительный нагрев, вибрационное воздействие, а также правильный подбор полимеризационных ламп [6–9]. И хотя каждый метод по отдельности придает композитам определенные улучшения их физических свойств, актуальность проблемы остается острой [10–21].

На кафедре терапевтической стоматологии Кубанского государственного медицинского университета был разработан и запатентован (патент РФ на изобретение №2731821 от 08 сентября 2020 г.) метод пломбирования зубов композитным материалом с применением термовибрационного воздействия. Разработанный метод пломбирования зубов дал возможность сочетать вибрацию и нагрев композитного пломбировочного материала непосредственно в сформированной полости зуба с помощью ультразвуковой гигиенической или ортопедической насадки с гладкой рабочей поверхностью и ультразвукового аппарата мощностью 25 Вт. При этом в каждую порцию неполомеризованного композитного пломбировочного материала, находящегося в полости зуба, погружали ультразвуковую гигиеническую или ортопедическую насадку с гладкой рабочей поверхностью и с мощностью 25 Вт материал подвергали термовибрационному воздействию в течение 10 с, после чего пломбу фотополимеризовали.

Цель исследования – оценка эффективности влияния термовибрационного воздействия на прочность на изгиб и твердость поверхности композитных пломбировочных материалов.

Материалы и методы исследования. Испытания прочности на изгиб осуществляли в соответствии с ГОСТ Р 56924-2016 (ISO 4049:2009) «Стоматология. Материалы полимерные восстановительные».

Для проведения данного исследования были изготовлены балки из композитных материалов размером 25/2/2 мм (длина/ширина/высота – Д/Ш/В) в общем количестве 150 штук. Материалы были разделены на две группы: контрольную и основную. В контрольной группе ($n = 25$) использовались образцы из трех композитов: Estelite Sigma Quick фирмы Tokuyama Dental (Япония), Filtek Bulk Fill Posterior Restorative фирмы 3M Espe (США) и «ДентЛайт» фирмы «ВладМиВа» (Россия), полимеризация которых проводилась по классическому методу с применением композита комнатной температуры. В основной группе ($n = 25$) использовались образцы из этих же трех композитов, но перед полимеризацией на них предварительно оказывалось термовибрационное воздействие (согласно разработанному патенту РФ на изобретение №2731821 от 08 сентября 2020 г.) (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Распределение образцов композитов в группах для исследования прочности на изгиб и твердость поверхности по Виккерсу

Table 1. Distribution of the composite samples in the study groups of bending strength and surface hardness according to Vickers

Группа	Метод подготовки композита перед полимеризацией	Композиты
Контрольная ($n = 25$)	Классический (композит комнатной температуры)	Estelite Sigma Quick, Filtek Bulk Fill Posterior Restorative, «ДентЛайт»
Основная ($n = 25$)	Термовибрационное воздействие	

Для этой цели в программе для трехмерного моделирования 3ds Max был разработан разборный шаблон для создания образцов композитов в виде балок (Д/Ш/В = 25/2/2 мм) (рис. 1).

Данный шаблон, изготовленный на стоматологическом фрезерном станке DWX-52D фирмы Roland (Япония) из полиметилметакрилата (ПММА) фирмы Chongqing Zotion Dentistry Technology Co., Ltd (Китай) (рис. 2), позволяет получать балки размером 25×2×2 мм (Д/Ш/В) (рис. 3).

Благодаря тому что шаблон был изготовлен из ПММА, композитный материал не прилипает к его поверхности, а возможность его разбора на несколько частей позволяет извлекать композитные балки после полимеризации без лишнего механического давления.

На гладкую стеклянную прозрачную поверхность шаблона (стекло для замешивания стоматологических материалов) помещали одну порцию композита. Для предотвращения образования

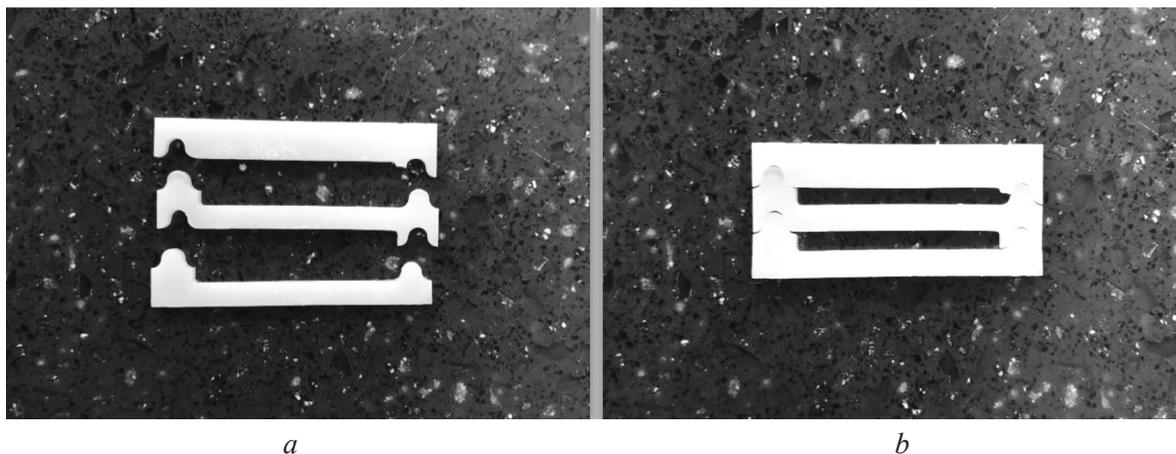


Рис. 1. Шаблон для изготовления образцов композитов в разобранном (а) и собранном (b) состоянии
 Fig. 1. Template for manufacturing composite samples in disassembled (a) and assembled (b) condition



Рис. 2. Фрезерный станок DWX-52D
 фирмы Roland (Япония)
 Fig. 2. Milling machine DWX-52D
 by Roland (Japan)



Рис. 3. Готовые образцы композитов для проведения исследования
 прочности на изгиб
 Fig. 3. Ready-made composite samples for studying
 the bending strength

пустот внутри образца пломбировочный материал плотно распределяли внутри шаблона с помощью шпателя, а излишки удаляли. После этого композитные балки в контрольной группе ($n = 25$) полимеризовали диодной полимеризационной лампой Bluephase Style фирмы Ivoclar Vivadent (Лихтенштейн) в течение 60 с с обеих сторон по всей длине образца на максимально близком расстоянии. В основной группе ($n = 25$) композит подвергали термовибрационному воздействию (согласно разработанному патенту РФ на изобретение № 2731821 от 08 сентября 2020 г.) ультразвуковой насадкой с гладкой рабочей поверхностью фирмы Asteon (Франция) из серии Perfect Margin PM3 с помощью ультразвукового аппарата Newtron Booster фирмы Asteon (Франция) мощностью 25 Вт в течение 10 с, после чего композит в течение 60 с полимеризовали диодной полимеризационной лампой Bluephase Style фирмы Ivoclar Vivadent (Лихтенштейн) с обеих сторон по всей длине образца на максимально близком расстоянии. По окончании полимеризации шаблон разбирали, а композитные балки извлекали и шлифовали дисками Sof-Lex светло-красного и оранжевого цвета фирмы 3M Espe (США). После полной подготовки балки нумеровали соответствующим шифром и выдерживали минимум 24 ч перед исследованием в связи с тем, что после активации полимеризационной лампы конверсия полимеризации внутри композита составляет 50–60 %, а в последующие сутки – еще 30–40 %.

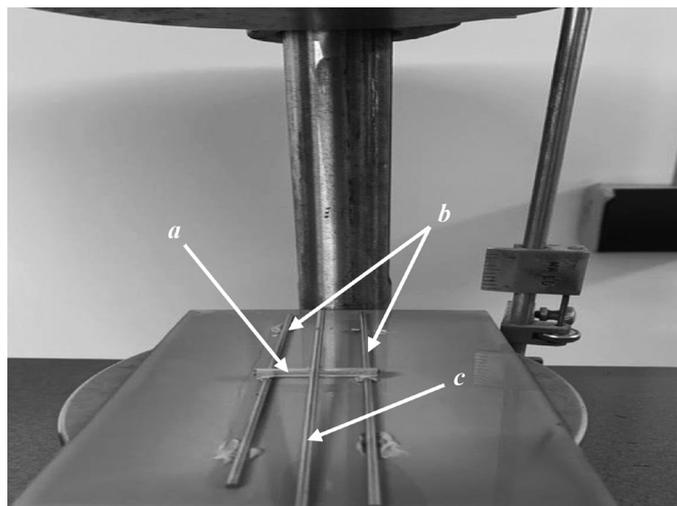


Рис. 4. Расположение образцов на трех балках для испытания прочности на изгиб на испытательной машине «МИП-10» (*a* – испытуемые образец; *b* – опорные стержни; *c* – нагружающий стержень)

Fig. 4. Sample location on three beams for testing the bending strength on the MIP-10 testing machine (*a* – test sample; *b* – support rods; *c* – loading rod)

В ходе исследования было изготовлено 25 образцов для каждого вида композита в зависимости от групповой принадлежности образца (всего 150 образцов).

На Краснодарском приборном заводе «Каскад» изготовленные образцы по очереди были установлены в испытательную машину «МИП-10» фирмы «НПК «ТЕХМАШ»» (Россия). Устройство для изгиба состояло из двух стержней диаметром 2 мм, смонтированных параллельно на расстоянии $20 \pm 0,1$ мм между центрами и третьим стержнем диаметром 2 мм, расположенным по центру между первыми двумя и параллельно им так, чтобы эту комбинацию из трех стержней можно было применять для нагружения образца по типу трехточечного изгиба (рис. 4).

Перед проведением исследования каждый образец измеряли (в центре) с помощью микрометра с точностью 0,01 мм, после чего композитную балку устанавливали в устройство для испытания

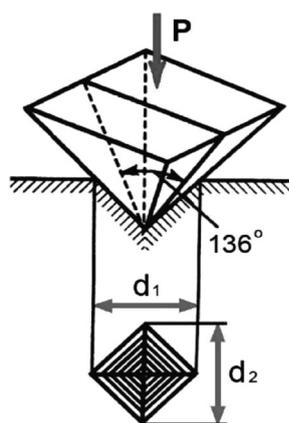


Рис. 5. Индентор и отпечаток для определения твердости методом Виккерса. *P* – нагрузка, кгс; *d*₁ и *d*₂ – диагонали отпечатка, мм

Fig. 5. Indenter and imprint for determining the hardness by the Vickers method. *P* is the load, kgf; *d*₁ and *d*₂ are the print diagonals, mm

на изгиб и приступали к нагрузке на образец. Нагружение продолжали до тех пор, пока образец не разрушится, после чего записывали максимальную нагрузку, действующую на образец в момент разрушения. Подобным образом испытанию подвергали все образцы.

Значения показателей предельной прочности на изгиб (σ , МПа) вычисляли по формуле $\sigma = 3Fl/2bh^2$, где *F* – максимальная нагрузка, действующая на образец, Н; *l* – расстояние между опорами с точностью до 0,01 мм; *b* – ширина в центре образца, измеренная непосредственно перед испытанием, мм; *h* – высота в центре образца, измеренная непосредственно перед испытанием, мм.

Полученные данные вносили в сводную таблицу для статистической обработки.

Твердость по Виккерсу (HV, кгс/мм²) определяли путем вдавливания алмазной пирамиды, угол при вершине которой составляет 136°. Индентор, применяемый в тестах по Виккерсу, – пирамида с квадратным основанием, противоположные стороны которой сходятся на вершине под углом 136° (рис. 5).

Твердость поверхности измеряли с помощью аппарата «ПМТ-3» фирмы «Ломо» (Россия) (рис. 6). Измерение проводили в течение 6 с при силе давления 100 гр.

При измерении твердости по Виккерсу соблюдали следующие условия: плавное возрастание нагрузки до необходимого значения; обеспечение

перпендикулярности приложения действующего усилия к испытываемой поверхности; поддержание постоянства приложенной нагрузки в течение установленного времени; расстояние между центром отпечатка и краем образца или соседнего отпечатка – не менее 2,5 длины диагонали отпечатка.

Для определения твердости поверхности представленных композитов изготавливали композитные диски диаметром не менее 6 мм и толщиной не менее 1,5 мм (рис. 7).

Композитный материал распределяли в виде плотного шарика на гладкой ровной поверхности стекла для замешивания стоматологических материалов. При подготовке образцов для контрольной группы использовали композит комнатной температуры, в основной группе композит в течение 10 с подвергали термовибрационному воздействию (согласно разработанному патенту РФ на изобретение № 2731821 от 08 сентября 2020 г.) ультразвуковой насадки с гладкой рабочей поверхностью фирмы Asteon (Франция) из серии Perfect Margin PM3 с помощью ультразвукового аппарата Newtron Booster фирмы Asteon (Франция) мощностью 25 Вт. Затем композитный шарик сверху накрывали другим стеклом для замешивания стоматологических материалов и раздавливали до необходимых размеров, после чего через стекло с помощью диодной полимеризационной лампы Bluephase Style фирмы Ivoclar Vivadent (Лихтенштейн) в течение 20 с проводили полимеризацию. Перед измерением твердости поверхности по Виккерсу все образцы выдерживали не менее 24 ч для получения максимальной полимеризации материала.

После измерений полученные данные вносили в формулу для определения твердости по Виккерсу:

$$HV = 2P \sin(0,5\alpha/d^2) = 1,8544P/d^2,$$

где P – прилагаемая нагрузка, кгс; d – среднее арифметическое значение длин обеих диагоналей отпечатка после снятия нагрузки, мм; α – лицевой угол индентора (136°).

Результаты и их обсуждение. У образцов, изготовленных без предварительного термовибрационного воздействия, средние значения показателей прочности на изгиб у композитов Estelite Sigma Quick, Filtek Bulk Fill Posterior Restorative и «ДентЛайт» составили $80,97 \pm 5,52$; $80,15 \pm 16,73$ и $82,92 \pm 18,10$ МПа соответственно (табл. 2). Эти значения попарно не отличались

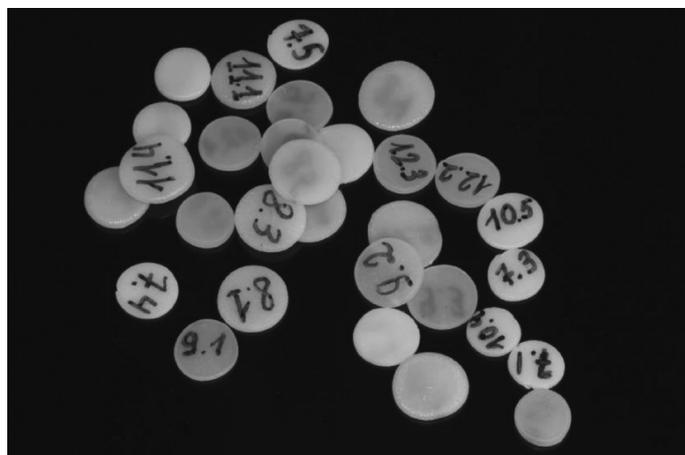


Рис. 7. Готовые образцы композитов для проведения испытаний на твердость поверхности по Виккерсу

Fig. 7. Ready-made composite samples for conducting a Vickers surface hardness test



Рис. 6. Микротвердометр «ПМТ-3» фирмы «Ломо» (Россия)

Fig. 6. Microhardometer PMT-3 of the LOMO Company (Russia)

Таблица 2. Средние значения показателей прочности на изгиб у образцов из различных композитов без применения термовибрационного воздействия (контрольная группа) и с применением термовибрационного воздействия (основная группа) ($M \pm SD$)

Table 2. Average values of the bending strength indicators of the samples from various composites without the use of thermal vibration exposure (control group) and with the use of thermal vibration exposure (main group) ($M \pm SD$)

Композит	Показатель прочности на изгиб, МПа		Отношение средних значений	t-критерий Стьюдента
	Контрольная группа ($n = 25$)	Основная группа ($n = 25$)		
Estelite Sigma Quick	80,97 ± 5,52	99,85 ± 6,92*	1,23	$p < 0,001$
Filtek Bulk Fill Posterior Restorative	80,15 ± 16,73	118,20 ± 10,81	1,47	$p < 0,001$
«ДентЛайт»	82,92 ± 18,10	118,10 ± 15,85	1,42	$p < 0,001$
F (критерий Фишера)	$p = 0,751$	$p < 0,001$		
R ² (коэффициент детерминации)	0,8	35,8		

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – статистически значимые отличия между средними значениями показателей образцов из различных композитов для контрольной группы и группы исследования.

значимо друг от друга ($p_{\text{FD}} = 0,538$, $p_{\text{ED}} = 0,539$, $p_{\text{EF}} = 0,818$). Распределение чисел в группах образцов разных композитов соответствовало нормальному распределению (критерий Шапиро–Уилка), при попарном сравнении применяли критерий Стьюдента.

При использовании однофакторного дисперсионного анализа не выявлено статистически значимых различий между средними значениями в зависимости от используемого композита (по критерию Фишера $p = 0,751$). Влияние вида композита в контрольной группе было на уровне 0,8 %.

У образцов, изготовленных из различных композитов с применением предварительного термовибрационного воздействия, наибольшие средние значения показателей прочности на изгиб были у композитов Filtek Bulk Fill Posterior Restorative и «ДентЛайт» – $118,20 \pm 10,81$ и $118,10 \pm 15,85$ МПа соответственно. Эти значения значимо не отличались друг от друга ($p = 0,976$). Среднее значение Estelite Sigma Quick статистически значимо отличалось от значений образцов из остальных композитов и было равно $99,85 \pm 6,92$ МПа ($p < 0,001$). Распределение чисел в группах образцов разных композитов соответствовало нормальному (критерий Шапиро–Уилка), при попарном сравнении применяли критерий Стьюдента.

Одновременно проводили попарное сравнение для одного вида композита – с применением и без применения предварительного термовибрационного воздействия. Во всех группах отмечалось статистически значимое увеличение ($p < 0,001$): для Estelite Sigma Quick – в 1,23 раза, для Filtek Bulk Fill Posterior Restorative – в 1,47, для «ДентЛайта» – в 1,42 раза.

Полученные значения показателей твердости поверхности по Виккерсу были статистически обработаны и внесены в сводную таблицу (табл. 2).

У образцов, изготовленных из различных композитов без применения предварительного термовибрационного воздействия, наибольшие средние значения показателей твердости поверхности по Виккерсу были у композитов Filtek Bulk Fill Posterior Restorative и Estelite Sigma Quick – $90,72 \pm 5,27$ и $74,97 \pm 9,6$ кгс/мм² соответственно (табл. 3). Эти значения статистически значимо отличались друг от друга ($p < 0,001$). Среднее значение «ДентЛайта» статистически значимо отличалось от такового у образцов из композита Filtek Bulk Fill Posterior Restorative ($p < 0,001$) и было равно $71,74 \pm 9,12$ кгс/мм², не отличалось от среднего значения образцов из композита Estelite Sigma Quick ($p = 0,231$). Распределение чисел в группах образцов разных композитов соответствовало нормальному (критерий Шапиро–Уилка), при попарном сравнении применяли критерий Стьюдента.

У образцов, изготовленных из различных композитов с применением предварительного термовибрационного воздействия, наименьшие средние значения показателей твердости поверхности по Виккерсу были у композитов «ДентЛайт» и Estelite Sigma Quick – $88,50 \pm 4,90$ и $91,22 \pm 8,49$ кгс/мм² соответственно. Эти значения значимо не отличались друг от друга ($p = 0,172$). А вот у Filtek Bulk Fill Posterior Restorative среднее значение статистически значимо отличалось от такового у образцов из остальных композитов и было наибольшим – $109,61 \pm 6,32$ кгс/мм² ($p < 0,001$). Распределение чисел в группах образцов разных композитов соответствовало нормальному (критерий Шапиро–Уилка), при попарном сравнении применяли критерий Стьюдента.

Т а б л и ц а 3. Средние значения показателей твердости поверхности по Виккерсу у образцов из различных композитов без применения термовибрационного воздействия (контрольная группа) и с применением термовибрационного воздействия (основная группа) ($M \pm SD$)

Table 3. Average values of Vickers surface hardness indices of samples from various composites without the use of thermo-vibration exposure (control group) and with the use of thermo-vibration exposure (main group) ($M \pm SD$)

Композит	Показатель твердости поверхности, кгс/мм ²		Отношение средних значений	t-критерий Стьюдента
	Контрольная группа (n = 25)	Основная группа (n = 25)		
Estelite Sigma Quick	74,97 ± 9,66	91,22 ± 8,49	1,22	$p < 0,001$
Filtek Bulk Fill Posterior Restorative	90,72 ± 5,27*	109,61 ± 6,32*	1,21	$p < 0,001$
«ДентЛайт»	71,74 ± 9,12	88,50 ± 4,90	1,23	$p < 0,001$
F (критерий Фишера)	$p < 0,001$	$p < 0,001$		
R ² (коэффициент детерминации)	51,3	66,9		

Кроме того, было проведено попарное сравнение показателей твердости поверхности по Виккерсу для одного вида композита группы с применением и без применения предварительного термовибрационного воздействия. Во всех группах отмечалось статистически значимое увеличение данного показателя ($p < 0,001$): для «ДентЛайта» – в 1,23 раза, для Filtek Bulk Fill Posterior Restorative – в 1,21, для Estelite Sigma Quick – в 1,22 раза.

Результаты исследования прочности на изгиб всех образцов различных композитов контрольной и основной групп показали, что композиты, подвергшиеся предварительному термовибрационному воздействию перед фотополимеризацией, имели более высокие показатели прочности на изгиб, чем образцы, полимеризованные классическим методом при комнатной температуре без применения термовибрационного воздействия. Образцы композитов основной группы имели более высокие показатели прочности на изгиб в сравнении с образцами контрольной группы – на 23,32; 47,47 и 42,43 % соответственно ($p < 0,001$).

Результаты исследования твердости поверхности по Виккерсу всех образцов различных композитов контрольной и основной групп показали, что композиты, подвергшиеся предварительному термовибрационному воздействию перед фотополимеризацией, имели более высокие показатели твердости поверхности по Виккерсу, нежели образцы, полимеризованные классическим методом при комнатной температуре без применения термовибрационного воздействия. Образцы композитов основной группы имели более высокие показатели твердости поверхности по Виккерсу в сравнении с образцами контрольной группы – на 21,68; 20,82 и 23,36 % соответственно.

Заключение. Таким образом, термовибрационное воздействие на композит непосредственно перед его полимеризацией позволяет получить материал с более высокими прочностными характеристиками, такими как прочность на изгиб и твердость поверхности, что способствует увеличению срока службы пломб и снижению риска образования вторичного кариеса после пломбирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Хабадзе, З. С. Лабораторное обоснование эффективности предполимеризационного нагрева нанокompозитного материала / З. С. Хабадзе // Эндодонтия today. – 2020. – Т. 18, № 1. – С. 15–20.
2. Wright, M. C. Bulk and microscale composition analysis / M. C. Wright // Failure Analysis Prevention / ed. : B. A. Miller [et al.]. – Materials Park, Ohio, 2021. – P. 85–91.
3. Ison как метод выбора неинъекционного метода лечения начального кариеса у пациентов с фибродисплазией оксифицирующей прогрессирующей: клинический случай / А. В. Севбитов [и др.] // Рос. стоматол. журн. – 2019. – Т. 23, № 6. – С. 280–283.
4. Изменение микроструктуры эмали и дентина под влиянием ротационного инструмента при лечении кариеса (исследование *in vitro*) / Б. Р. Шумилович [и др.] // Рос. стоматол. журн. – 2017. – Т. 21, № 2. – С. 68–71.
5. Музылева, Т. А. Современные адгезивные системы в клинической стоматологии / Т. А. Музылева // Студ. вестн. – 2019. – Т. 38-2 (88). – С. 21–22.
6. Адамчик, А. А. Оценка полимеризации композита / А. А. Адамчик // Кубан. науч. мед. вестн. – 2015. – № 1. – С. 7–11.
7. Yang, J. N. Effects of preheated composite on micro leakage-an *in vitro* study / J. N. Yang, J. D. Raj, H. Sherlin // J. Clin. Diagn. Res. – 2016. – Vol. 10, N 6. – P. 36–38. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18084.7980>
8. The effect of composite resin preheating on marginal adaptation of class II restorations / F. Darabi [et al.] // J. Clin. Exp. Dent. – 2020. – Vol. 12, N 7. – P. 682–687. <https://doi.org/10.4317/jced.56625>

9. Elolimy, G. A. Effect of pre-heating on hardness, flexural properties and depth of cure of dental two resin composites / G. A. Elolimy // *Egypt. Dent. J.* – 2020. – N 3. – P. 1731–1739. <https://doi.org/10.21608/EDJ.2020.24610.1043>
10. Чухрай, И. Г. Ошибки и осложнения, возникающие при изготовлении реставраций из композиционных материалов / И. Г. Чухрай, Н. В. Новак, Е. И. Марченко // *Соврем. стоматология.* – 2014. – № 1 (58). – С. 20–25.
11. An update on the reasons for placement and replacement of direct restorations / D. Eltahlah [et al.] // *J. Dent.* – 2018. – N 72. – P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.03.001>
12. Rondoni, D. Composite layered overlay: micro-invasive approach / D. Rondoni // *Endodontol. Today.* – 2019. – Vol. 17, N 4. – P. 67–69. <https://doi.org/10.36377/1683-2981-2019-17-4-67-69>
13. Боровский, Е. В. Кариез зубов: препарирование и пломбирование / Е. В. Боровский. – М. : Стоматология, 2001. – 144 с.
14. Rubnikovich, S. P. Morphological changes in bone tissue around dental implants after low-intensity ultrasound applications / S. P. Rubnikovich, I. S. Khomich, Yu. L. Denisova // *Вест. НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 20–27.
15. The effect of magnetophototherapy on morphological changes of tissues of pathologically changed periodontium / S. P. Rubnikovich [et al.] // *Med. News North Caucasus.* – 2017. – Vol. 12, N 3. – P. 303–307. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12095>
16. Rubnikovich, S. P. Digital laser speckle technologies in measuring blood flow in biotissues and the stressed-strained state of the maxillo-dental system / S. P. Rubnikovich, Yu. L. Denisova, N. A. Fomin // *J. Eng. Phys. Thermophys.* – 2017. – Vol. 90, N 6. – P. 1513–1523. <https://doi.org/10.1007/s10891-017-1713-8>
17. Laser speckle technology in stomatology. Diagnostics of stresses and strains of hard biotissues and orthodontic and orthopedic structures / Yu. L. Denisova [et al.] // *J. Eng. Phys. Thermophys.* – 2013. – Vol. 86, N 4. – P. 940–951. <https://doi.org/10.1007/s10891-013-0915-y>
18. Bazylev, N. B. Investigation of the stressed-strained state of cermet dentures using digital laser speckle-photographic analysis / N. B. Bazylev, S. P. Rubnikovich // *J. Eng. Phys. Thermophys.* – 2009. – Vol. 82, N 4. – P. 789–793. <https://doi.org/10.1007/s10891-009-0247-0>
19. Laser monitor for soft and hard biotissue analysis using dynamic speckle photography / N. Fomin [et al.] // *J. Laser Phys.* – 2003. – Vol. 13, N 5. – P. 786–795.
20. Effect of preheating on the cytotoxicity of bulk-fill composite resins / M. E. Ebrahimi Chaharom [et al.] // *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects.* – 2020. – Vol. 14, N 1. – P. 19–25. <https://doi.org/10.34172/joddd.2020.003>
21. Response of composite resins to preheating and the resulting strengthening of luted feldspar ceramic / N. F. Coelho [et al.] // *Dent. Mater.* – 2019. – Vol. 35, N 10. – P. 1430–1438. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.07.021>

References

1. Khabadze Z. S. Laboratory substantiation of the efficiency of pre-polymerization heating of nanocomposite material. *Endodontiya today* [Endodontics today], 2020, vol. 18, no. 1, pp. 15–20 (in Russian).
2. Wright M. C. Bulk and microscale composition analysis. *Failure Analysis and Prevention*. Materials Park, Ohio, 2021, pp. 85–91. <https://doi.org/10.31399/asm.hb.v11.a0006759>
3. Sevbitov A. V., Dan'shina S. D., Kuznetsova M. Yu., Platonova V. V., Borisov V. V. Icon as a method of choice for injectable treatment of initial caries in patients with ossifying progressive fibrodysplasia: a clinical case. *Rossiiskii stomatologicheskii zhurnal* [Russian journal of dentistry], 2019, vol. 23, no. 6, pp. 280–283 (in Russian).
4. Shumilovich B. R., Leshcheva E. A., Kharitonov D. Yu., Morozov A. N., Saneev A. V. Change of the microstructure of enamel and dentin under the influence of the rotary tool in the treatment of caries (*in vitro* study). *Rossiiskii stomatologicheskii zhurnal* [Russian journal of dentistry], 2017, vol. 21, no. 2, pp. 68–71 (in Russian).
5. Muzyleva T. A. Modern adhesive systems in clinical dentistry. *Studencheskii vestnik* [Student bulletin], 2019, vol. 38-2 (88), pp. 21–22 (in Russian).
6. Adamchik A. A. Appraisal of composite's polymerization. *Kubanskii nauchnyi meditsinskii vestnik* [Kuban scientific medical bulletin], 2015, no. 1, pp. 7–11 (in Russian).
7. Yang J. N., Raj J. D., Sherlin H. Effects of preheated composite on micro leakage-an *in vitro* study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2016, vol. 10, no. 6, pp. 36–38. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18084.7980>
8. Darabi F., Tayefeh-Davalloo R., Tavangar S. M., Naser-Alavi F., Boorboo-Shirazi M. The effect of composite resin preheating on marginal adaptation of class II restorations. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 2020, vol. 12, no. 7, pp. 682–687. <https://doi.org/10.4317/jced.56625>
9. Elolimy G. A. Effect of pre-heating on hardness, flexural properties and depth of cure of dental two resin composites. *Egyptian Dental Journal*, 2020, no. 3, pp. 1731–1739. <https://doi.org/10.21608/EDJ.2020.24610.1043>
10. Chukhrai I. G., Novak N. V., Marchenko E. I. Mistakes and the complications arising at production of restorations from composite materials. *Sovremennaya stomatologiya* [Modern dentistry], 2014, no. 1 (58), pp. 20–25 (in Russian).
11. Eltahlah D., Lynch C. D., Chadwick B. L., Blum I. R., Wilson N. H. F. An update on the reasons for placement and replacement of direct restorations. *Journal of Dentistry*, 2018, no. 72, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.03.001>
12. Rondoni D. Composite layered overlay: micro-invasive approach. *Endontology Today*, 2019, vol. 17, no. 4, pp. 67–69. <https://doi.org/10.36377/1683-2981-2019-17-4-67-69>
13. Боровский Е. В. *Dental caries: preparation and filling*. Moscow, Stomatologiya Publ., 2001. 144 p. (in Russian).
14. Rubnikovich S. P., Khomich I. S., Denisova Yu. L. Morphological changes in bone tissue around dental implants after low-intensity ultrasound applications. *Vesti Natsyonalnai akademii navuk Belarusi. Seryya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 20–27 (in Russian).

15. Rubnikovich S. P., Maizet A. I., Denisova Yu. L., Bykova N., Arutyunov A., Kopylova I. A., Avanesyan R. A. The effect of magnetophototherapy on morphological changes of tissues of pathologically changed periodontium. *Medical News of the North Caucasus*, 2017, vol. 12, no. 3, pp. 303–307. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12095>
16. 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>
17. 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>
18. Bazylev N. B., Rubnikovich S. P. Investigation of the stressed-strained state of cermet dentures using digital laser speckle-photographic analysis. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2009, vol. 82, no. 4, pp. 789–793. <https://doi.org/10.1007/s10891-009-0247-0>
19. Fomin N., Fuentes C., Hirano T., Rubnikovich S., Bazylev N., Lavinskaya E. [et al.]. Laser monitor for soft and hard biotissue analysis using dynamic speckle photography. *Journal of Laser Physics*, 2003, vol. 13, no. 5, pp. 786–795.
20. Ebrahimi Chaharom M. E., Bahari M., Safyari L., Safarvand H., Shafaei H., Jafari Navimipour E., Alizadeh Oskoe P., Ajami A. A., Abed Kahnamouei M. Effect of preheating on the cytotoxicity of bulk-fill composite resins. *Journal of Dental Research Dental Clinics Dental Prospects*, 2020, vol. 14, no. 1, pp. 19–25. <https://doi.org/10.34172/joddd.2020.003>
21. Coelho N. F., Barbon F. J., Machado R. G., Boscato N., Moraes R. R. Response of composite resins to preheating and the resulting strengthening of luted feldspar ceramic. *Dental Materials*, 2019, vol. 35, no. 10, pp. 1430–1438. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.07.021>

Информация об авторах

Гущин Александр Александрович – аспирант. Кубанский государственный медицинский университет (ул. им. Седина, 4, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация). E-mail: doctor-stomatolog@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0002-8773-5231>

Адамчик Анатолий Анатольевич – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Кубанский государственный медицинский университет (ул. им. Седина, 4, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация). E-mail: adamchik1@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2861-0260>

Рубникович Сергей Петрович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, ректор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rubnikovich@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-7450-3757>

Запорожская-Абрамова Екатерина Сергеевна – канд. мед. наук, ассистент. Кубанский государственный медицинский университет (ул. им. Седина, 4, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация). E-mail: dr.katerina_abramova@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0675-6581>

Иващенко Виктория Александровна – канд. мед. наук, ассистент. Кубанский государственный медицинский университет (ул. им. Седина, 4, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация). E-mail: vikato777@mail.ru

Соловьева Жанна Владимировна – канд. мед. наук, ассистент. Кубанский государственный медицинский университет (ул. им. Седина, 4, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация). E-mail: janna_soul@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-6591-395X>

Таиров Валерий Владиславович – канд. мед. наук, доцент. Кубанский государственный медицинский университет (ул. им. Седина, 4, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация). E-mail: vtaitov@mail.ru

Рисованный Сергей Исаакович – канд. мед. наук, профессор. Кубанский государственный медицинский университет (ул. им. Седина, 4, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация). E-mail: kls.kuban@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-0970-3701>

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. <https://orcid.org/0000-0003-0917-7972>

Information about the authors

Alexander A. Gushchin – Postgraduate student. Kuban State Medical University (4, Sedin Str., 350063, Krasnodar, Russian Federation). E-mail: doctor-stomatolog@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0002-8773-5231>

Anatoly A. Adamchik – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. Kuban State Medical University (4, Sedin Str., 350063, Krasnodar, Russian Federation). E-mail: adamchik1@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2861-0260>

Sergey P. Rubnikovich – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Rector. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rubnikovichs@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-7450-3757>

Ekaterina S. Zaporozhskaya-Abramova – Ph. D. (Med.), Assistant. Kuban State Medical University (4, Sedin Str., 350063, Krasnodar, Russian Federation). E-mail: dr.katerina_abramova@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0675-6581>

Victoria A. Ivashchenko – Ph. D. (Med.), Assistant. Kuban State Medical University (4, Sedin Str., 350063, Krasnodar, Russian Federation). E-mail: vikato777@mail.ru

Zhanna V. Solovyeva – Ph. D. (Med.), Assistant. Kuban State Medical University (4, Sedin Str., 350063, Krasnodar, Russian Federation). E-mail: janna_soul@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-6591-395X>

Valery V. Tairov – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Kuban State Medical University (4, Sedin Str., 350063, Krasnodar, Russian Federation). E-mail: vtaitov@mail.ru

Sergey I. Risovannyi – Ph. D. (Med.), Professor. Kuban State Medical University (4, Sedin Str., 350063, Krasnodar, Russian Federation). E-mail: kls.kuban@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-0970-3701>

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. <https://orcid.org/0000-0003-0917-7972>

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.98:578.834.1]:616.15-085.246.2

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-112-119>

Поступила в редакцию 30.06.2021

Received 30.06.2021

Р. Э. Якубцевич¹, Д. Н. Ракашевич¹, И. Н. Невгень²

¹Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

²Гродненская университетская клиника, Гродно, Республика Беларусь

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕМОСОРБЦИИ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА, ВЫЗВАННОГО КОРОНОВИРУСОМ SARS-CoV-2

Аннотация. Коронавирусная инфекция представляет собой клинический синдром, вызываемый мутационным РНК-вирусом (SARS-CoV-2). При тяжелом течении заболевание характеризуется развитием цитокинового шторма, который приводит к развитию синдрома полиорганной дисфункции и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), обуславливающих высокую летальность. Для подавления цитокиновой агрессии у пациентов с тяжелым течением COVID-19 рекомендована медикаментозная супрессия, однако в качестве альтернативного метода патогенетически может быть применена и гемосорбция.

Целью исследования являлась оценка эффективности гемосорбции с использованием гемосорбента «Гемо-Протеазосорб» по сравнению с медикаментозной супрессией тоцилизумабом при тяжелом течении COVID-19.

Изучены клинико-лабораторные показатели 88 пациентов, находившихся на лечении в отделении анестезиологии-реанимации. Все пациенты были разделены на две группы: Гемо-Протеазосорб ($n = 53$) и Тоцилизумаб ($n = 33$).

На фоне проведения гемосорбции с использованием сорбента «Гемо-Протеазосорб» отмечено статистически значимое снижение уровня прокальцитонина, С-реактивного белка, лейкоцитов, фибриногена, Д-димеров, повышение числа лимфоцитов, а также более раннее повышение респираторного индекса, чем в группе, где проводилась терапия тоцилизумабом. В ходе исследования установлено, что использование отечественного сорбента «Гемо-Протеазосорб» имеет ряд преимуществ перед медикаментозной супрессией цитокинового шторма тоцилизумабом ввиду более выраженных эффектов иммуномодуляции, улучшения кислородтранспортной функции крови, ее реологических свойств и возможности эффективного применения у лиц с вирусно-бактериальной инфекцией.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, цитокины, цитокиновый шторм, гемосорбция, «Гемо-Протеазосорб», тоцилизумаб, медикаментозная супрессия

Для цитирования: Якубцевич, Р. Э. Эффективность гемосорбции для подавления цитокинового шторма, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2 / Р. Э. Якубцевич, Д. Н. Ракашевич, И. Н. Невгень // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 112–119. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-112-119>

Ruslan E. Yakubtsevich¹, Dzmitry N. Rakashevich¹, Irina N. Neuhen²

¹Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

²Grodno University Hospital, Grodno, Republic of Belarus

HEMOSORPTION EFFICIENCY FOR SUPPRESSING THE CYTOKINE STORM CAUSED BY CORONAVIRUS SARS-CoV-2

Abstract. Coronavirus infection is a clinical syndrome caused by a mutational RNA virus (SARS-CoV-2). In severe cases, it is characterized by the development of a “cytokine storm”. The latter leads to the multiple organ dysfunction, ARDS and causes high mortality. To suppress the cytokine aggression in patients with severe COVID-19, the drug suppression is recommended; however, the use of hemosorption can be pathogenetically justified as an alternative method.

The aim of the study was to assess the effectiveness of hemosorption using the hemosorbent “Hemo-Proteazosorb” in the severe COVID-19 infection course in comparison to the drug suppression with tocilizumab.

We studied the clinical and laboratory parameters of 88 patients who were treated at the anesthesiology and intensive care department. All patients were divided into 2 groups: Hemo-Proteazosorb ($n = 53$) and Tocilizumab ($n = 33$).

Against the background of hemosorption using the Hemo-Proteazosorb sorbent, statistically the level of procalcitonin, C-reactive protein, leukocytes, fibrinogen, D-dimers significantly decreases, the number of lymphocytes increases, as well as the respiratory index earlier grows in comparison with the group receiving tocilizumab therapy. The study found that the use of hemosorption through the domestic sorbent “Hemo-Proteazosorb” has a number of advantages over the drug suppression of the “cytokine storm” with tocilizumab due to the more pronounced effects of immunomodulation, improvement of the oxygen transport function of blood, its rheological properties and the possibility of effective use in persons with viral bacterial infection.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, cytokines, cytokine storm, hemosorption, “Hemo-Proteazosorb”, tocilizumab, drug suppression

For citation: Yakubtsevich R. E., Rakashevich Dz. N., Neuhen I. N. Hemosorption efficiency for suppressing the cytokine storm caused by coronavirus SARS-CoV-2. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 112–119 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-112-119>

Введение. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19), возникшая в 2019 г. в Китае, быстро распространилась по всем континентам и уже 2 года имеет статус пандемии, несмотря на усилия врачей и ученых по всему миру. Коронавирусная болезнь представляет собой вызываемый мутационным РНК-вирусом (SARS-CoV-2) клинический синдром, вследствие которого происходит иммунитет-опосредованное повреждение дыхательной, сердечно-сосудистой, мочевыделительной, гепатобилиарной и центральной нервной систем человека. У большинства пациентов заболевание протекает в легкой или средней тяжести форме и не носит жизнеугрожающего характера. Однако при тяжелом течении инфекции летальность достигает 42–62 % [1, 2]. Такая высокая летальность обусловлена синдромом активации макрофагов, известным также как гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, приводящий к развитию цитокинового шторма и способствующий развитию острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [3].

Цитокиновый шторм, возникающий как ответная реакция на вирус (SARS-CoV-2), представляет собой агрессивный воспалительный ответ с выбросом большого количества провоспалительных цитокинов. Наиболее значимыми из них являются IL-1, TNF- α и IL-6 [4].

Всплеск цитокинов вызывает приток к месту инвазии различных иммунных клеток, таких как макрофаги, нейтрофилы и Т-клетки, что приводит к дестабилизации эндотелиальных клеток, повреждению сосудистого барьера, диффузному альвеолярному повреждению, оказывая разрушительное действие на ткани и органы человека, и, в итоге, к полиорганной недостаточности. Гипервоспаление, вызываемое коронавирусами, отличается от других форм вирусного цитокинового шторма умеренным повышением ферритина и тропностью вируса к легочной ткани. Доказательством этому являются результаты исследования, проведенного в Гонконгском университете. По данным аутопсии, у 2 из 6 пациентов, умерших от тяжелого течения инфекции SARS-CoV-1, был обнаружен гемофагоцитоз легких. Гемофагоцитоз – признак повреждения цитокинами легочной ткани во время цитокинового шторма [5].

Рассматривая цитокиновый шторм, особое внимание следует обратить на IL-6, так как интерлейкины являются первичными медиаторами в каскаде воспалительной реакции и играют главную роль как предикторы летального исхода. В этой связи у пациентов с гиперцитокинемией патогенетически обосновано применение тоцилизумаба, представляющего рекомбинантный гуманизированный антагонист рецептора IL-6. По результатам ретроспективных исследований, проведенных в Китае, где у пациентов с тяжелой инфекцией SARS-CoV-2, осложненной цитокиновым штормом и ОРДС, на фоне терапии тоцилизумабом наблюдалось исчезновение лихорадки и гипоксемии, снижение уровня С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови и уменьшение объема поражения легких по данным компьютерной томографии [6]. Результаты проведенного в трех больницах Италии исследования, опубликованные в журнале *Lancet Rheumatology*, продемонстрировали значимое снижение риска при проведении пациентам инвазивной ИВЛ или уровня смертности у пациентов с тяжелым течением пневмонии, вызванной COVID-19, которые получали ингибитор IL-6 – тоцилизумаб [7]. При применении данного препарата следует учитывать риск возникновения дивертикулита, печеночного повреждения, кандидемии и инвазивного кандидоза. Также следует обратить внимание на потенциальную опасность возникновения инфекционных заболеваний. Присоединение бактериальной флоры к вирусной инфекции у пациентов с иммуносупрессией может привести к сепсису [8].

Альтернативой медикаментозной супрессии цитокинового шторма и предотвращения его губительного влияния на организм могут быть методы экстракорпорального очищения крови (ЭОК). Учеными дано патофизиологическое обоснование ЭОК для восстановления «иммунного гомеостаза» во время цитокинового шторма разного происхождения [9].

В апреле 2020 г. FDA разрешило применение гемосорбции через гемоадсорбер на основе полистирола Cytosorb у пациентов с развившимся цитокиновым штормом. Исходя из результатов

клинического опыта, FDA подтвердило эффективность сорбции через Cytosorb у таких пациентов ввиду снижения провоспалительных цитокинов в сыворотке крови после проведенной процедуры [10].

По промежуточным результатам обсервационного исследования, проведенного в Германии, у пациентов с положительным тестом ПЦР на SARS-CoV-2 и признаками развивающегося цитокинового шторма с уровнем С-реактивного белка (СРБ) ≥ 100 мг/л, прокальцитонина (PCT) < 2 нг/л уровень выживаемости на фоне гемосорбции с использованием Cytosorb повышался [11].

Рандомизированное исследование Dr. Liang Yu из Китая, посвященное элиминации цитокинов с помощью селективного гемосорбента HA-330, продемонстрировало снижение уровня TNF- α , IL-6 в исследуемой группе уже в первые часы после сорбции. Через 72 ч у пациентов группы Гемосорбция показатели респираторного индекса увеличились с 74,0 до 222,2 (в контрольной группе – с 83,0 до 122,9), количество баллов по шкале APACHE уменьшилось с 16 до 13,5 (в контрольной группе отмечалось повышение баллов с 13 до 18 баллов), а индекс тяжести пневмонии по сравнению с контрольной группой уменьшился с 126,5 до 83 баллов (в контрольной группе отмечалось повышение баллов с 125 до 164). Летальность пациентов группы «Гемосорбция» по сравнению с контрольной группой оказалась в 3 раза ниже (15,4 % против 47,6 % в контрольной группе) [12].

По результатам клинического опыта, полученного в Национальном медицинском исследовательском центре кардиологии Российской Федерации, при использовании цитокиновой сорбции с применением сорбента HA-330 у всех пациентов наблюдалось снижение уровня маркеров цитокинового шторма, при этом у 70 % из них отмечалась положительная клиническая динамика при отсутствии осложнений, связанных с проводимой процедурой [13].

На основании клинического опыта и данных, полученных по результатам исследований, Китай, США, Италия, Россия по состоянию на 03.06.2020 официально включили экстракорпоральные методы детоксикации в рекомендации по лечению COVID-19.

Целью исследования являлась оценка эффективности гемосорбции с использованием гемосорбента «Гемо-Протеазосорб» по сравнению с медикаментозной супрессией тоцилизумабом при тяжелом течении COVID.

Материалы и методы исследования. Изучены клинико-лабораторные показатели 88 пациентов, находившихся на лечении в отделении анестезиологии и реанимации № 1 УЗ «Гродненская университетская клиника» с тяжелым течением COVID-19 и развившимся цитокиновым штормом. Все пациенты были разделены на две группы: Гемо-Протеазосорб ($n = 53$) – применен стандартный протокол лечения с гемосорбцией с использованием «Гемо-Протеазосорба»; Тоцилизумаб ($n = 33$) – применен рекомбинантный гуманизированный антагонист рецептора IL-6 – тоцилизумаб.

Всем пациентам группы Гемо-протеазосорб была выполнена процедура гемосорбции с использованием антипротеиназного биоспецифического гемосорбента «Гемо-протеазосорб» (Республика Беларусь). Перед началом гемоперфузии пунктировали и катетеризировали одну из центральных вен. До начала процедуры внутривенно вводили 5000 ЕД гепарина. Подключение экстракорпорального контура осуществляли с соблюдением правил асептики. Перед гемоперфузией массообменники промывали в 5-кратном объеме стерильного 0,9 %-ного раствора NaCl. После этого осуществляли забор крови из вены в магистраль для гемоперфузии МКА 0/330-МКВ01 однократного применения с помощью роликового насоса BP-742 («Фрезениус», Германия). Кровь проходила через колонку с сорбентом «Гемо-Протеазосорб», после чего возвращалась в предварительно катетеризованную периферическую вену. Скорость перфузии крови по магистрали составляла 80–90 мл/мин. Процедура продолжалась 60 мин. Количество сеансов за время лечения – от 3 до 6.

Тоцилизумаб вводили внутривенно капельно однократно в дозе 4–8 мг/кг массы тела (обычно 400, максимум 800 мг), при недостаточном ответе препарат вводили повторно в течение последующих 12 ч, однако суммарная доза не превышала 800 мг. Критериями исключения применения тоцилизумаба были сопутствующая инфекция, отличная от COVID-19; тяжелый ОРДС, сопровождающийся нахождением пациента на ИВЛ; хроническое или текущее применение глюкокортикоидов; наличие в анамнезе тяжелых аллергических реакций на моноклональные антитела; нейтропения менее 500/мкл или тромбоцитопения менее $50 \cdot 10^9$ /л; активный дивертикулит, воспалительные заболевания кишечника или другие симптоматические заболевания ЖКТ; поражение почек или печени.

Забор крови для исследования осуществляли за 6 ч до проведения процедуры экстракорпорального очищения крови в первой исследуемой группе и за 6 ч до введения тоцилизумаба во второй группе. Контроль результатов осуществляли на 3-и и 5–7-е сутки в обеих группах.

Общий анализ крови исследовали на анализаторе ABX Micros (Roche, Франция). Изучали следующие показатели: количество эритроцитов, тромбоцитов, нейтрофилов, лейкоцитов, уровень гемоглобина. Концентрацию общего белка, фибриногена, Д-димеров определяли биохимическим методом на аппарате Architect®c8000 System (США). Уровни СРБ, РСТ определяли методом иммуноферментного анализа на аппарате Abbot AxSYM® System (США). Для комплексной оценки дыхательной функции рассчитывали респираторный индекс (OI), который представляет собой отношение FiO_2 (% кислорода во вдыхаемой смеси) к SpO_2 (сатурация артериальной крови кислородом).

Статистическую обработку полученного материала проводили с помощью лицензионной программы Statistica 10.0 (Statsoft Inc, США). Статистические параметры нормально распределенных признаков описывали средними значениями (M). С помощью медианы (Me) и интерквартильного размаха (значения 25-го и 75-го перцентилей) выражали величины, распределение которых было отличным от нормального, а также величины, не имеющие приблизительно нормального распределения. Значимость результатов оценивали методом зависимых признаков, используя непараметрический критерий Вилкоксона (Wilcoxon test). При сравнении независимых групп с отличным от нормального распределением значений одного или двух количественных признаков применяли непараметрический метод – U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень статистической значимости принимали за $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Анализ лабораторных показателей при поступлении в отделение реанимации показал, что у пациентов исследуемых групп отмечаются высокие уровни СРБ, РСТ, лейкоцитов, в частности нейтрофилов, а также депрессия уровня лимфоцитов, что свидетельствует о цитокиновом шторме, вызванном SARS-CoV-2. Установлено, что на исходных этапах (до лечения) в обеих исследуемых группах уровень РСТ выше референсных значений. В группе 1 (Гемо-Протеазосорб) значения значимо выше по сравнению с группой 2 (Тоцилизумаб), что свидетельствует о наличии вирусно-бактериальной инфекции с риском сепсиса у пациентов, которым проводилась гемосорбция.

На 3-и сутки лечения в группе 1 (Гемо-Протеазосорб) отмечалась тенденция к снижению уровней СРБ, РСТ, лейкоцитов, в частности нейтрофилов, но при этом наблюдался значимый рост лимфоцитов. На последнем этапе (5–7-е сутки) исследования отмечались значимое снижение уровней СРБ, РСТ, повышение уровня лейкоцитов по сравнению с исходным этапом (до лечения), а также рост лимфоцитов (данные недостоверны).

В группе 2 (Тоцилизумаб) на всех этапах исследования наблюдалась тенденция к значимому снижению уровней СРБ, лейкоцитов, в частности нейтрофилов. Следует отметить, что ни на одном этапе исследования в группе 2 не наблюдалось статистически значимого снижения уровня РСТ и роста лимфоцитов (табл. 1).

Таблица 1. Динамика изменения маркеров воспаления у пациентов с COVID-19 в группах Гемо-Протеазосорб и Тоцилизумаб

Table 1. Dynamics of changes in the inflammation markers in patients with COVID-19 in the Hemo-Proteasosorb and Tocilizumab groups

Показатель	Этап исследования	Группа 1 (Гемо-Протеазосорб)		Группа 2 (Тоцилизумаб)	
		Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>	Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>
СРБ, мг/л	До лечения	132,8 (10,6–303)		87,85 (25,3–144,1)	0,003000 ⁺
	На 3-и сутки лечения	51,7 (1,2–182)	0,000001 [*]	18,15 (4,7–71,6)	0,000018 [*] 0,001621 ⁺
	На 5–7-е сутки лечения	51 (2,2–253)	0,000008 [*]	4,75 (2,3–124,4)	0,000008 [*] 0,000006 ⁺
РСТ, нг/мл	До лечения	0,275 (0,07–21,25)		0,16 (0,03–0,69)	0,0155 ⁺
	На 3-и сутки лечения	0,115 (0,04–11,91)	0,0002 [*]	0,13 (0,03–0,56)	0,2868 [*] 0,8124 ⁺
	На 5–7-е сутки лечения	0,22 (0,05–9,29)	0,3882 [*]	0,05(0,05–1,2)	0,8658 [*] 0,0134 ⁺

Окончание табл. 1

Показатель	Этап исследования	Группа 1 (Гемо-Протеазосорб)		Группа 2 (Тоцилизумаб)	
		Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>	Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	До лечения	13,2 (2,1–29,0)		11,42 (3,21–24,08)	0,0308⁺
	На 3-и сутки лечения	11,17 (2,76–26,97)	0,0026[*]	10,03 (2,19–24,2)	0,3694 [*] 0,3174 ⁺
	На 5–7-е сутки лечения	15,03 (1,34–38,4)	0,0820 [*]	11,06 (2,08–36,9)	0,7869 [*] 0,0382⁺
Нейтрофилы, $\times 10^9$ клеток/л	До лечения	90 (66–100)		89,5 (70–100)	0,7863 ⁺
	На 3-и сутки лечения	85 (63–100)	0,014[*]	88 (50–100)	0,0371[*] 0,6015 ⁺
	На 5–7-е сутки лечения	83 (38–97)	0,006[*]	86 (65–97)	0,0298[*] 0,7125 ⁺
Лимфоциты, $\times 10^9$ клеток/л	До лечения	6 (0–26)		7 (0–21)	0,3726 ⁺
	На 3-и сутки лечения	9 (0–23)	0,015[*]	8,5 (0–39)	0,3224 [*] 0,9229 ⁺
	На 5–7-е сутки лечения	8 (2–27)	0,073 [*]	8 (2–28)	0,1965 [*] 0,6575 ⁺

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: * – уровень *p* по отношению к началу лечения (критерий Вилкоксона); «+» – уровень *p* по отношению к аналогичному этапу лечения в группе 1 (критерий Манна–Уитни); выделенные жирным шрифтом значения указывают на достоверность *p*-различий.

Из представленных данных следует, что в группе Гемо-Протеазосорб наблюдается тенденция к депрессии уровня эритроцитов, но референсные значения на всех этапах находятся в пределах нормы. Уровни гемоглобина на 3-и и 5–7-е сутки значимо ниже по сравнению с исходными, что связано с тяжелой эндотоксемией у пациентов исследуемой группы.

В группе, где применялся тоцилизумаб, отмечался рост уровня эритроцитов на 3-и сутки, а на 5–7-е сутки их повышение становилось недостоверным по сравнению с исходными значениями. Уровень гемоглобина в группе 2 на всех этапах лечения соответствовал референсным значениям.

Следует констатировать, что в группе 1 (Гемо-Протеазосорб) на 3-и сутки наблюдалась тенденция к увеличению респираторного индекса, а на 5–7-е сутки после первого сеанса гемосорбции выявлено его дальнейшее повышение. При проведении медикаментозной супрессии цитокинового шторма с помощью тоцилизумаба статистически значимый рост индекса оксигенации был отмечен только на 5–7-е сутки (табл. 2).

Таблица 2. Динамика изменения показателей, характеризующих кислородтранспортную функцию крови у пациентов с COVID-19 в группах Гемо-Протеазосорб и Тоцилизумаб

Table 2. Dynamics of changes in the indicators characterizing the oxygen transport function of blood in patients with COVID-19 in the Hemo-Proteasosorb and Tocilizumab groups

Показатель	Этап исследования	Группа 1 (Гемо-Протеазосорб)		Группа 2 (Тоцилизумаб)	
		Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>	Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	До лечения	4,15 (2,49–6,49)		5,01 (3,21–6,13)	0,0004⁺
	На 3-и сутки лечения	3,92 (2,77–5,82)	0,0538 [*]	5,3 (2,74–6,85)	0,0287[*] 0,000005⁺
	На 5–7-е сутки лечения	3,91 (2,5–5,44)	0,0155[*]	4,96 (2,94–7,35)	0,9094 [*] 0,000371⁺
Гемоглобин, г/л	До лечения	121 (81–186)		138 (85–165)	0,009760⁺
	На 3-и сутки лечения	112 (77–161)	0,031[*]	143 (74–179)	0,0308[*] 0,000100⁺
	На 5–7-е сутки лечения	114 (78–158)	0,011[*]	141 (79–192)	0,7413 [*] 0,001776⁺
OI	До лечения	2,21 (0,87–3,3)		1,92 (1,07–3,23)	0,5088 ⁺
	На 3-и сутки лечения	2,38 (0,85–4,71)	0,0183[*]	1,95 (0,91–3,33)	0,3469 [*] 0,4164 ⁺
	На 5–7-е сутки лечения	2,43 (0,84–4,67)	0,0043[*]	2,43 (0,91–4,67)	0,0058[*] 0,9636 ⁺

На исходных этапах (до лечения) у пациентов обеих исследуемых групп наблюдались высокие уровни фибриногена и Д-димеров, что обуславливало высокий риск тромбообразования, в частности тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА).

В группе, где проводилась гемосорбция, отмечалась тенденция к значимому снижению уровней Д-димеров и фибриногена на 3-и сутки, а на 5–7-е сутки наблюдался незначительный рост этих показателей по сравнению с таковыми на предыдущем этапе исследования. Уровень фибриногена в группе 2 (Тоцилизумаб) значимо снижался на 3-и и 5–7-е сутки, при этом тенденция к значимому росту Д-димеров наблюдалась на всех этапах исследования. Анализ уровня тромбоцитов в обеих группах показал, что его значения на всех этапах исследования находятся в пределах нормы (табл. 3).

Таблица 3. Динамика изменения показателей гемостаза у пациентов с COVID-19 в группах Гемо-Протеазосорб и Тоцилизумаб

Table 3. Dynamics of changes in hemostasis indicators in patients with COVID-19 in the Hemo-Proteasosorb and Tocilizumab groups

Показатель	Этап исследования	Группа 1 (Гемо-Протеазосорб)		Группа 2 (Тоцилизумаб)	
		Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>	Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>
Фибриноген, г/л	До лечения	10,4 (4,41–19,4)		8,75 (5,6–12,6)	0,00371⁺
	На 3-и сутки лечения	6,7 (2,8–14,7)	0,000000003[*]	4,77 (3,54–7,63)	0,000004[*] 0,001459⁺
	На 5–7-е сутки лечения	7,7 (2,3–17,9)	0,00000058[*]	3,7 (1,2–7,8)	0,000003[*] 0,000029⁺
Д-димеры, мкг/мл	До лечения	1390 (365–6390)		475,5 (291–3530)	0,000189⁺
	На 3-и сутки лечения	1030 (301–3247)	0,000068[*]	563 (308–3160)	0,045794[*] 0,186038⁺
	На 5–7-е сутки лечения	1167 (341–10000)	0,20868 [*]	741 (308–5316)	0,006082[*] 0,189051⁺
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	До лечения	255 (55–641)		213 (98–449)	0,286137⁺
	На 3-и сутки лечения	250 (37–612)	0,375 [*]	265 (110–583)	0,002386[*] 0,763243 ⁺
	На 5–7-е сутки лечения	281 (30–751)	0,090 [*]	253 (100–557)	0,033182[*] 0,569792 ⁺

Следует констатировать, что депрессия уровня общего белка в обеих исследуемых группах была обусловлена тяжелым течением COVID-19, а в группе Гемо-Протеазосорб она проявлялась и как побочный эффект при проведении гемосорбции (табл. 4).

Приведенные выше результаты свидетельствуют об эффективности медикаментозной супрессии цитокинового шторма при использовании тоцилизумаба и, как альтернатива, гемосорбции с применением отечественного гемосорбента «Гемо-Протеазосорб» ввиду значительного снижения содержания маркеров воспаления (СРБ, РСТ, лейкоциты, нейтрофилы) в сыворотке крови. Согласно полученным нами результатам, гемосорбция предпочтительна у пациентов

Таблица 4. Динамика изменения уровня общего белка (г/л) у пациентов с COVID-19 в группах Гемо-Протеазосорб и Тоцилизумаб

Table 4. Dynamics of changes in the total protein level (g/l) in patients with COVID-19 in the Hemo-Proteasosorb and Tocilizumab groups

Этап исследования	Группа 1 (Гемо-Протеазосорб)		Группа 2 (Тоцилизумаб)	
	Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>	Me (25 %, 75 %)	<i>p</i>
До лечения	56 (43–96)		57 (45–71)	0,7282 ⁺
На 3-и сутки лечения	52 (40–64)	0,001[*]	51 (46–65)	0,0056[*] 0,8986 ⁺
На 5–7-е сутки лечения	52 (41–72)	0,037[*]	52 (40–70)	0,0052[*] 0,4780 ⁺

с цитокиновым штормом, осложненным присоединением бактериальной инфекции, ввиду значимой экстракорпоральной элиминации РСТ, что согласуется с данными литературы, обосновывающими применение данной методики у пациентов с сепсисом [14]. Из преимуществ гемосорбции стоит выделить рост уровня лимфоцитов, способствующий борьбе организма с вирусной инфекцией, и значимое повышение респираторного индекса через 3 сут после проведения процедуры экстракорпоральной детоксикации (при применении тоцилизумаба эффект наблюдался только на 5–7-е сутки).

Выводы

1. Применение гемосорбции для подавления цитокинового шторма, вызванного SARS-CoV-2, обосновано в случае риска возникновения генерализованной бактериальной инфекции, когда использование тоцилизумаба противопоказано.

2. Выполнение гемосорбции позволяет в более короткие сроки по сравнению с медикаментозной супрессией тоцилизумабом увеличить респираторный индекс у пациентов с тяжелым течением COVID-19.

3. Гемосорбция с использованием отечественного сорбента «Гемо-Протеазосорб», в отличие от применения тоцилизумаба, позволяет добиться снижения уровня Д-димеров, что существенно уменьшает риск возникновения микро- и макротромбозов, в частности ТЭЛА.

4. Увеличение числа лимфоцитов, наблюдаемое при проведении гемосорбции, подтверждает иммуномодулирующий эффект данной методики экстракорпоральной детоксикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation Report 127 [Electronic resource] / World Health Organization. – Mode of access : [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200526-covid-19-sitrep-127.pdf?sfvrsn=\\$7b6655ab_8](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200526-covid-19-sitrep-127.pdf?sfvrsn=$7b6655ab_8). – Date of access : 23.05.2021.
2. ICU and ventilator mortality among critically ill adults with COVID-19: preprint 2020.04.23.20076737: It is made available under a CC-BY-NC-ND 4.0 / S. Auld [et al.] // medRxiv. – 2020. – 12 p. – Mode of access : <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.23.20076737v1.full.pdf>. – Date of access : 23.05.2021.
3. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment / M. Soy [et al.] // Clin. Rheumatol. – 2020. – Vol. 39, N 7. – P. 2085–2094. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05190-5>
4. The COVID-19 cytokine storm; What we know so far / D. Ragab [et al.] // Front. Immunol. – 2020. – Vol. 11. – Art. 1446. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01446>
5. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome / J. M. Nicholls [et al.] // Lancet. – 2003. – Vol. 3615, N 9371. – P. 1773–1778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13413-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13413-7)
6. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab / Xiaoling Xu [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2020. – Vol. 117, iss. 20. – P. 10970–10975. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005615117>
7. Tocilizumab in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study / G. Guaraldi [et al.] // Lancet Rheumatol. – 2020. – Vol. 2, N 8. – P. e474–e484. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30173-9](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30173-9)
8. Treat 2019 novel coronavirus (COVID-19) with IL-6 inhibitor: are we already that far? / Y. Zhang [et al.] // Drug Discov. Ther. – 2020. – Vol. 14, N 2. – P. 100–102. <https://doi.org/10.5582/ddt.2020.03006>
9. Ronco, C. Sepsis: theory and therapies / C. Ronco, R. Bellomo, G. Lonneman // New Engl. J. Med. – 2003. – Vol. 348, N 16. – P. 1600–1602. <https://doi.org/10.1056/NEJM200304173481616>
10. Emergency use authorizations for medical devices [Electronic resource] / FDA. – Mode of access : <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-med-ical-devices/emergency-use-authorizations>. – Date of access : 29.05.2021.
11. CytoResc – “CytoSorb” rescue for critically ill patients undergoing the COVID-19 cytokine storm: a structured summary of a study protocol for a randomized controlled trial / H. Stockmann [et al.] // Trials. – 2020. – Vol. 21, N 1. – P. 577. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04501-0>
12. Yu, L. Haemoperfusion: A promising extracorporeal blood purification therapy in improving the ICU outcomes of critically ill patients with COVID-19 [Electronic resource] / L. Yu. – Mode of access : <https://www.youtube.com/watch?v=9AjiFYVfuUA>. – Date of access : 20.05.2021.
13. Певзнер, Д. В. Цитокиновая сорбция в лечении пациентов с COVID-19 [Электронный ресурс] / Д. В. Певзнер. – Режим доступа : <https://jafron.ru/wp-content/uploads/2020/08/Academic%20Perspectives.pdf>. – Дата доступа : 20.05.2021.
14. Якубцевич, Р. Э. Гемокоррекция и экстракорпоральное очищение крови в элиминации токсических метаболитов при сепсисе и критических состояниях, связанных с дисрегуляцией метаболических процессов / Р. Э. Якубцевич. – Гродно : ГрГМУ, 2017. – 207 с.

References

1. World Health Organization. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation Report 127*. Available at : [https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situationreports/20200526-covid-19-sitrep127.pdf?sfvrsn=\\$=7b6655ab_8](https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situationreports/20200526-covid-19-sitrep127.pdf?sfvrsn=$=7b6655ab_8) (accessed 23.05.2021).
2. Auld S., Caridi-Scheible M., Blum J. M., Robichaux C. J., Kraft C. S., Jacob J. T. [et al.]. ICU and ventilator mortality among critically ill adults with COVID-19: preprint 2020.04.23.20076737: It is made available under a CC-BY-NC-ND 4.0. *medRxiv*, 2020, p. 12. Available at : <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.23.20076737v1.full.pdf> (accessed 23.05.2021).
3. Soy M., Keser G., Atagündüz P., Tabak F., Atagündüz I., Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clinical Rheumatology*, 2020, vol. 39, no. 7, pp. 2085–2094. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05190-5>
4. Ragab D., Eldin H. S., Taaimah M., Khattab R., Salem R. The COVID-19 cytokine storm; What we know so far. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 11, art. 1446. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01446>
5. Nicholls J. M., Poon L. L. M., Lee K. C., Ng W. F., Lai S. T., Leung C. Y. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2020, vol. 3615, no. 9371, pp. 1773–1781. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13413-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13413-7)
6. Xu X., Han M., Li T., Sun W., Wang D., Fu B. [et al.]. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, vol. 117, no. 20, pp. 10970–10975. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005615117>
7. Guaraldi G., Meschiari M., Cozzi-Lepri A., Milic J., Tonelli R., Menozzi M. [et al.]. Tocilizumab in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatology*, 2020, vol. 2, no. 8, pp. e474–e484. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30173-9](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30173-9)
8. Zhang Y., Zhong Y., Pan L., Dong J. Treat 2019 novel coronavirus (COVID-19) with IL-6 inhibitor: are we already that far? *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2020, vol. 14, no. 2, pp. 100–102. <https://doi.org/10.5582/ddt.2020.03006>
9. Ronco C., Bellomo R., Lonneman G. Sepsis: theory and therapies. *New England Journal of Medicine*, 2003, vol. 348, no. 16, pp. 1600–1602. <https://doi.org/10.1056/NEJM200304173481616>
10. FDA. *Emergency use authorizations for medical devices*. Available at : <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations> (accessed 29.05.2021).
11. Stockmann H., Keller T., Büttner S., Jörres A., Kindgen-Milles D., Kunz J. V. [et al.]. CytoResc – “CytoSorb” rescue for critically ill patients undergoing the COVID-19 cytokine storm: a structured summary of a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 2020, vol. 21, no. 1, p. 577. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04501-0>
12. Yu L. *Haemoperfusion: a promising extracorporeal blood purification therapy in improving the ICU outcomes of critically ill patients with COVID-19*. Available at : <https://www.youtube.com/watch?v=9AjiFYVfuUA> (accessed 20.05.2021).
13. Pevzner D. V. *Cytokine sorption in the treatment of patients with COVID-19*. Available at : <https://jafron.ru/wp-content/uploads/2020/08/Academic%20Perspectives.pdf> (accessed 20.05.2021) (in Russian).
14. Yakubtsevich R. E. *Hemocorrection and extracorporeal blood purification in the elimination of toxic metabolites in sepsis and critical conditions associated with dysregulation of metabolic processes*. Grodno, Grodno State Medical University, 2017, p. 207 (in Russian).

Информация об авторах

Якубцевич Руслан Эдуардович – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: jackruslan@tut.by

Ракашевич Дмитрий Николаевич – преподаватель-стажёр. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: www.rakashevichdima2011@mail.ru

Невген Ирина Николаевна – врач анестезиолог-реаниматолог, заведующий отделением. Гродненская университетская клиника (б-р Ленинского комсомола, 52, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: nevgen. irina@gmail.com

Information about the authors

Ruslan E. Yakubtsevich – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: jackruslan@tut.by

Dzmitry N. Rakashevich – Trainee teacher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: www.rakashevichdima2011@mail.ru

Irina N. Neuchen – anesthesiologist-resuscitator, Head of the Department. Grodno University Clinic (52, Leninski Komsomol Blvd, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: nevgen.irina@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 617-089
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-120-128>

Поступила в редакцию 24.06.2021
Received 24.06.2021

А. А. Камендровская¹, С. Д. Федянин¹, А. А. Коваленко¹, Ю. И. Ратомский²

¹*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Республика Беларусь*

²*Витебская городская центральная клиническая больница, Витебск, Республика Беларусь*

ВЛИЯНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ АСПИРАТОВ КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ В НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЯХ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ АНГИОПАТИЕЙ

Аннотация. Одним из самых опасных осложнений сахарного диабета является поражение сосудов нижних конечностей. При развитии критической ишемии прогноз неблагоприятный.

Цель работы – оценить влияние аутологичных аспириатов красного костного мозга на микроциркуляцию в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с диабетической ангиопатией.

В исследование было включено 36 пациентов, страдающих диабетической ангиопатией нижних конечностей: в основную группу вошли 20 человек, которым в комплексе лечебных мероприятий была выполнена реваскуляризирующая аутомиелотрансплантация, в группу сравнения – 16 пациентов, получавших стандартное комплексное консервативное лечение.

Всем лицам производили пульсоксиметрию на первом пальце стопы перед началом лечения и в контрольные сроки. Кроме того, оценивали дистанцию безболевого ходьбы и определяли стадию хронической артериальной недостаточности.

В основной группе нижние конечности сохранились у 18 пациентов, в группе сравнения – у 10 ($p_{\text{Cox-Mantel}} = 0,015$).

Через 3–6 мес. после лечения в основной группе отмечалось увеличение дистанции безболевого ходьбы у 15 из 18 человек. В группе сравнения улучшения не отмечалось. Хронические раны зажили у 4 из 7 пациентов.

Медиана показателя SpO₂ в основной группе составляла 96 [92; 97] %, в группе сравнения – 90 [88; 92] % ($p_{\text{Mann-Whitney}} = 0,0035$).

Включение реваскуляризирующей аутомиелотрансплантации в комплексное лечение пациентов с диабетической ангиопатией нижних конечностей способствует сохранению нижней конечности, а также купированию признаков критической ишемии и заживлению хронических ран.

Ключевые слова: диабетическая ангиопатия нижних конечностей, пульсоксиметрия, хроническая артериальная недостаточность, ампутация, хронические раны

Для цитирования: Влияние аутологичных аспириатов красного костного мозга на микроциркуляцию в нижних конечностях у пациентов с диабетической ангиопатией / А. А. Камендровская [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 120–128. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-120-128>

Alina A. Kamiandrouskaya¹, Siarhey D. Fedzyanin¹, Andrey A. Kovalenko¹, Yury I. Ratomski²

¹*Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus*

²*Vitebsk City Central Clinic Hospital, Vitebsk, Republic of Belarus*

EFFECT OF AUTOLOGICAL RED BONE MARROW ASPIRATES ON THE MICROCIRCULATION IN THE LOWER EXTREMITIES OF PATIENTS WITH DIABETIC ANGIOPATHY

Abstract. The lesion of the lower extremities vessels is one of the most dangerous complications of diabetes mellitus. The prognosis is bad in case of the development of critical ischemia.

The aim of the study is to assess the effect of autological red bone marrow aspirates on the microcirculation in the soft tissues of the lower extremities of patients with diabetic angiopathy.

The study included 36 patients with diabetic angiopathy of the lower limbs. The main group of 20 people consisted of the patients, whose treatment was added by revascularizing automyelotransplantation. The comparison group (16 people) included the patients who received standard complex conservative treatment.

All patients underwent pulse oximetry on the 1st toe before the treatment start and within the control times. The painless walking distance was also assessed and the chronic arterial insufficiency stage was determined.

In the main group, 18 patients retained their lower limbs, in the comparison group – 10 patients ($p_{\text{Cox-Mantel}} = 0.015$).

There was an increase in the painless walking distance in 15 out of 18 patients in 3–6 months after treatment in the main group. There was no improvement in the comparison group. Chronic wounds healed in 4 out of 7 patients.

The median SpO₂ in the main group was 96 [92; 97] %, in the comparison group – 90 [88; 92] % ($p_{\text{Mann-Whitney}} = 0.0035$).

The inclusion of revascularizing automyelotransplantation in the complex treatment of patients with diabetic angiopathy of the lower extremities contributes to the lower extremity preservation, as well as the relief of critical ischemia signs and the healing of chronic wounds.

Keywords: diabetic angiopathy of the lower limbs, pulse oximetry, chronic arterial insufficiency, amputation, chronic wounds

For citation: Kamiandrouskaya A. A., Fedzyanin S. D., Kovalenko A. A., Ratomski Yu. I. Effect of autological red bone marrow aspirates on the microcirculation in the lower extremities of patients with diabetic angiopathy. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National, 5 Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 1, pp. 120–128 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-120-128>

Введение. Одним из самых опасных осложнений сахарного диабета (СД) является поражение сосудов нижних конечностей. При СД поражаются как крупные сосуды (макроангиопатия), так и мелкие (микроангиопатия). Из магистральных поражаются, как правило, сосуды, расположенные ниже щели коленного сустава [1]. При диабетической ангиопатии изменения гемодинамики происходят в первую очередь вследствие стеноза и окклюзии просвета магистральных артерий, что приводит к снижению перфузионного давления, запуская каскад локальных нарушений микроциркуляции [2]. В то же время синдром диабетической стопы определяется как инфекция, язва и/или деструкция тканей стопы, связанная с неврологическими нарушениями и/или снижением магистрального кровотока в сосудах нижних конечностей [3, 4]. Таким образом, при поражении артерий нижних конечностей при СД наблюдается взаимное отягощающее влияние микроциркуляции и состояния магистральных артерий.

Чаще всего пациенты, страдающие диабетической ангиопатией нижних конечностей, обращаются за медицинской помощью, когда ситуация уже запущена, т. е. имеют место трофические нарушения и боль в покое, что, по классификации Фонтейна–Покровского, соответствует хронической артериальной недостаточности (ХАН) 3–4-й стадии. У этих пациентов развивается критическая ишемия нижних конечностей – декомпенсация ХАН, характеризующаяся такими клиническими признаками, как боль в покое, не купируемая наркотическими анальгетиками, и/или наличие язвенно-некротического процесса в области стопы [2, 5, 6].

Термин «критическая ишемия нижних конечностей», принятый в 1982 г. рабочей группой сосудистых хирургов, первоначально означал боль в покое при лодыжечном давлении менее 40 мм рт. ст. или некроз тканей при лодыжечном давлении менее 60 мм рт. ст. у пациентов без СД. Пациенты, страдающие СД, не попадали под это определение в связи с влиянием на развитие процесса нейропатии и восприимчивости этих пациентов к инфекции [7]. Термин длительное время считался неудачным и регулярно обсуждался в связи с тем, что не включал в себя обширную группу пациентов с риском ампутации нижней конечности. В Международных сосудистых клинических рекомендациях 2019 г. был предложен термин «критическая ишемия, угрожающая потерей конечности», который включает гораздо более разнородные категории пациентов, находящихся в группе риска ампутации конечности. Таким образом, критическая ишемия, угрожающая потерей конечности, определяется как поражение периферических артерий в сочетании с ишемической болью в покое или трофическими нарушениями, а также с некрозами любого участка стопы, существующими более 4 недель [7].

При развитии критической ишемии прогноз неблагоприятный. Неустраненная критическая ишемия нижних конечностей у 22 % пациентов приводит к летальному исходу либо к ампутации в течение 12 мес. [8]. Реваскуляризация конечности проводится только у 50 % лиц, остальные получают консервативное лечение, эффективность которого крайне низкая. Сохранение конечности в течение 6 мес. возможно не более чем у 40 % пациентов. Примерно такому же количеству выполняется высокая ампутация [2, 5, 6].

Диагностические мероприятия при критической ишемии, угрожающей потерей конечности, направлены на объективное подтверждение диагноза, определение локализации поражения сосудов и степени выраженности ишемии, оценку возможностей реваскуляризации и индивидуального риска для эндоваскулярного или открытого вмешательства [2, 5–7].

В первую очередь при ведении пациентов с критической ишемией, угрожающей потерей конечности, необходимо определить состояние магистрального кровотока и уровень поражения

сосудов. Диагностические мероприятия должны включать в себя максимально неинвазивные и доступные методы обследования, начиная с физикального осмотра и тщательного сбора анамнеза [7]. Основным клиническим признаком нарушения магистрального кровотока рекомендуется считать наличие и внешний вид трофических нарушений нижних конечностей, увеличение размеров раневого дефекта, несмотря на проводимое консервативное лечение [3, 4].

Классические критерии критической ишемии не всегда могут быть применены к пациентам с диабетической ангиопатией нижних конечностей, так как выраженность болевого синдрома у лиц, страдающих СД, зачастую трудно оценить вследствие нейропатии. Измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) также не всегда достоверно отражает наличие критической ишемии, так как зачастую его значения превышают 1,3 вследствие выраженного медиокальциноза Мексберга [3–6].

В случае критической ишемии нижней конечности, развившейся при диабетической ангиопатии, рекомендуется основываться на клинических признаках, таких как боль в конечности, а также наличие трофических нарушений. Для верификации диагноза рекомендуется использование показателя насыщения кислородом гемоглобина артериальной крови ($TcPO_2$, SpO_2), а также лазерной доплеровской флоуметрии. Оба этих метода можно применять и для определения динамики репаративных процессов в стопе при оценке эффективности лечебных мероприятий [3, 4].

Прогрессирование диабетической ангиопатии ведет к развитию гангрены и последующей ампутации конечности. Несмотря на консервативное лечение, болезнь неуклонно прогрессирует. Поздняя стадия заболевания с трофическими нарушениями, поражение дистального сегмента, сопутствующая патология являются причинами отказа от реконструктивных операций у 50–75 % пациентов [9]. Именно методы непрямой реваскуляризации в данной ситуации могут использоваться с целью профилактики прогрессирования процесса, ведущего к высоким ампутациям нижних конечностей и инвалидности. Недостаточная эффективность существующих методов непрямой реваскуляризации (реваскуляризирующая остеотрепанация, поясничная симпатэктомия и др.) обуславливает поиск новых методов экзогенной стимуляции ангиогенеза [9, 10].

В последние годы в литературе все чаще встречаются данные о возможности использования прогениторных стволовых клеток периферической крови, костного мозга, жировой и эмбриональной ткани при стимуляции неоангиогенеза. Еще в конце XX в. использовались предшественники эндотелиальных клеток, выделенных из периферической крови. Так, был установлен положительный эффект лечения при подкожном введении аутологичных стволовых клеток периферической крови у пациентов с облитерирующими заболеваниями с терминальной стадией ишемии нижних конечностей [9].

Первыми аутологичную трансплантацию мононуклеарных клеток красного костного мозга осуществили Tateishi и Yuuama в 2002 г. В результате через 24 недели отмечалось увеличение ЛПИ, показателей транскутанного напряжения кислорода и длительности безболевого ходьбы [11].

В мировой литературе имеются данные об использовании клеточных технологий при лечении ишемической болезни сердца (ИБС), в офтальмологической практике – при реваскуляризации сетчатки, а также при операциях на головном мозге при болезни Моямой [12–14]. Кроме того, все чаще встречаются публикации об использовании мультипотентных клеток для непрямой реваскуляризации нижних конечностей [15–18]. Исследования с участием пациентов с критической ишемией конечностей показали, что применение трансплантации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в сочетании с эндотелиальными прогениторными клетками приводит к увеличению длительности безболевого ходьбы и повышению ЛПИ. При этом выполненная перфузионная сцинтиграфия подтвердила увеличение перфузии в конечности, подвергшейся лечению, в сравнении со второй нижней конечностью [19].

По данным мета-анализа [20], использование клеточных технологий в лечении критической ишемии нижних конечностей при облитерирующем атеросклерозе и облитерирующем тромбангиите привело к повышению транскутанного напряжения кислорода, увеличению дистанции безболевого ходьбы, уменьшению болей, заживлению язв за период наблюдения в течение 6 мес.

Также отмечено увеличение числа сохраненных конечностей при использовании клеточной терапии в сравнении с их числом в группе пациентов, получавших только стандартное консервативное лечение. Доказана безопасность и эффективность клеточной терапии [21].

Таким образом, необходимо дальнейшее изучение влияния трансплантации клеток красного костного мозга на оксигенацию тканей ишемизированных конечностей.

Цель исследования – оценить влияние аутологичных аспиратов красного костного мозга на микроциркуляцию в мягких тканях нижних конечностей у пациентов с диабетической ангиопатией.

Материалы и методы исследования. В исследовании приняли участие 36 пациентов с диабетической ангиопатией нижних конечностей, развившейся на фоне СД второго типа, находившихся на обследовании и лечении в Государственном учреждении здравоохранения «Витебская городская центральная клиническая больница» в 2018–2020 гг. У всех пациентов имелась ХАН 3–4-й стадии, поэтому выполнение реконструктивно-восстановительных вмешательств на артериях не представлялось возможным. В исследование не были включены пациенты с тяжелой сопутствующей патологией (онкологические заболевания, последствия острого нарушения мозгового кровообращения, выраженная легочно-сердечная недостаточность).

Методом простой рандомизации все пациенты были разделены на две группы. В основную группу вошли 20 пациентов, которым в комплексе лечебных мероприятий была выполнена реваскуляризирующая аутомиелотрансплантация (РАМТ), в группу сравнения – 16 пациентов, получавших стандартное комплексное консервативное лечение.

В основной группе было 11 мужчин и 9 женщин, в группе сравнения – 10 мужчин и 6 женщин. Медиана возраста в основной группе – 70 [65; 72,5] лет, в группе сравнения – 67 [61; 69] лет. Артериальная гипертензия (АГ) выявлена у всех пациентов обеих групп, ИБС – у 10 пациентов основной группы и у 9 пациентов группы сравнения, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – у 1 пациента основной группы и у 3 пациентов группы сравнения. Группы пациентов статистически значимо не различались по полу, возрасту и сопутствующей патологии (значения p приведены в табл. 1).

У 7 пациентов основной группы и у 8 группы сравнения выявлены трофические нарушения нижних конечностей, не заживающие более 2 недель, что также является признаком критической ишемии [7]. Размер ран составлял до 5 см². Группы были сопоставимы по данному признаку. Характеристика пациентов до начала лечения представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика пациентов до начала лечения

Table 1. Patient characteristics before treatment

Признак	Основная группа ($n = 20$)	Группа сравнения ($n = 16$)	p
М/Ж	11/9	10/6	$p_{\text{Fisher}} = 0,7$
Возраст, лет	70 [65; 72,5]	67 [61; 69]	$p_{\text{Mann-Whitney}} = 1,0$
Сопутствующая патология	АГ – 20, ИБС – 10, ХОБЛ – 1	АГ – 16, ИБС – 9, ХОБЛ – 3	Для АГ и ИБС $p_{\text{Fisher}} = 1,0$; для ХОБЛ $p_{\text{Fisher}} = 0,6$
Трофические нарушения	7	8	$p_{\text{Fisher}} = 1,0$

Консервативное лечение диабетической ангиопатии у пациентов обеих групп было одинаковым и осуществлялось по общепринятым схемам (спазмолитики, пентоксифиллин, реополилюкин, сахароснижающие препараты под контролем уровня глюкозы в крови, дезагреганты, анальгетики). Лечение хронических ран проводилось с использованием антисептиков (йодискин, диоксидин, септомирин, мукосанин, 3 %-ный раствор перекиси водорода) и мазей на жировой (метилурациловая, гентамициновая, синтомициновая эмульсия) и водорастворимой («Меколь», «Повидон-йод») основе с учетом фазы раневого процесса.

Методика РАМТ, использовавшаяся у пациентов основной группы, заключалась в следующем. В асептических условиях под местной анестезией с помощью иглы И. А. Кассирского выполняли



Рис. 1. Получение красного костного мозга с помощью стеральной пункции

Fig. 1. Obtaining the red bone marrow with the sternal puncture



Рис. 2. Введение красного костного мозга в мышцы конечности

Fig. 2. Injecting the red bone marrow into the limb muscles

стеральную пункцию и получали красный костный мозг в объеме от 20 до 140 мл (медиана 55 [45; 70] мл) (рис. 1).

После местной инфильтрационной анестезии через точки, расположенные на бедре и голени, в мышцы равными порциями вводили аспират красного костного мозга – от 1,5 до 10,5 мл (в зависимости от количества полученного костного мозга) (рис. 2).

Семи пациентам РАМТ выполняли дважды.

Всем лицам перед началом лечения и через 3–6 мес. после выписки из стационара производили пульсоксиметрию на первом пальце стопы. Для этого использовали пульсоксиметр «Оксимед» (модель JPD-500A, Китай). Ишемию конечности расценивали как критическую при значениях SpO_2 94 % и ниже [22].

Также у всех пациентов оценивали дистанцию безболевого ходьбы и определяли стадию ХАН до начала лечения и в контрольные сроки. Для этого использовали классификацию Покровского–Фонтейна.

Полученные в ходе исследования данные были обработаны с использованием лицензионных пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2016 и STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде абсолютных величин и процентов с расчетом для них 95 %-ного ДИ, Me, LQ, UQ, минимальных (min) и максимальных (max) значений. Для дальнейшего анализа применяли непараметрические методы статистики. Сравнение по количественным признакам между двумя независимыми группами производили с применением *U*-критерия Манна–Уитни. При сравнении качественных данных в двух независимых группах использовали двусторонний точный критерий Фишера. Сохранение конечности оценивали с помощью анализа выживаемости, для чего использовали критерий Кокса–Ментела. При $p \leq 0,05$ различия между исследуемыми показателями считали статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение. За период наблюдения в основной группе после выписки из стационара умер 1 пациент, еще 1 пациенту была ампутирована конечность на уровне бедра. В группе сравнения умерло 2 пациента, 4 пациентам была выполнена ампутация нижней конечности на уровне бедра. В основной группе нижние конечности сохранились у 18 пациентов, в группе сравнения – у 10 ($p_{\text{Cox-Mantel}} = 0,015$).

До начала лечения в основной группе было 13 пациентов с ХАН 3-й стадии и 7 человек с ХАН 4-й стадии, в группе сравнения – 4 пациента с ХАН 3-й стадии и 12 человек с ХАН 4-й стадии. Статистических различий между группами не выявлено ($p_{\text{Mann-Whitney}} = 0,09$).

Анализ данных пациентов, которым выполнена ампутация нижней конечности, показал, что до начала лечения у них была 4-я стадия ХАН и имелись трофические нарушения.

Через 3–6 мес. после лечения в основной группе отмечалось увеличение дистанции безболевой ходьбы у 15 из 18 человек. При этом у 9 пациентов была определена ХАН 2б стадии, у 3 пациентов – ХАН 1-й стадии. Все лица передвигались самостоятельно.

В группе сравнения не отмечалось увеличения длительности дистанции безболевой ходьбы. У всех пациентов сохранилась стадия ХАН, которая была определена до лечения. Различия в группах были статистически значимы ($p_{\text{Fisher}} = 0,0001$).

В основной группе до начала лечения значения SpO_2 составляли от 31 до 97 %, при медиане 93 [91; 96] %, в группе сравнения – от 30 до 95 % при медиане 90 [51; 93] %. Значения SpO_2 в группах статистически значимо не различались ($p_{\text{Mann-Whitney}} = 1,0$).

В основной группе значения SpO_2 94 % и ниже были выявлены у 14 пациентов до начала лечения, в группе сравнения – у 15 человек. Значения критического SpO_2 в группах статистически значимо не различались ($p_{\text{Fisher}} = 0,1$).

При этом обнаружено, что в основной группе у умершего пациента до начала лечения значение SpO_2 составляло 31 %. У пациента, которому выполнена ампутация нижней конечности, SpO_2 составляло 76 %.

В группе сравнения у трех умерших значения SpO_2 до начала лечения составляли 31, 42 и 90 %, а у пациентов, которым выполнена ампутация нижней конечности, значения SpO_2 составляли 30, 31, 92 и 94 %. В то же время в одном случае в группе сравнения сатурация после консервативного лечения выросла от 31 до 86 %.

Таким образом, можно предположить, что при экстремально низких значениях SpO_2 шансы на спасение конечности минимальны.

После лечения изменения значений SpO_2 варьировались в пределах от –4 до 30 % (медиана = 1,5 [1; 4]) в основной группе и от –30 до 55 % (медиана = –2 [–3; –1]) в группе сравнения. Изменения SpO_2 в группах имели статистически значимые отличия ($p_{\text{Mann-Whitney}} = 0,016$). При этом в основной группе у 14 человек отмечалось увеличение показателя SpO_2 , у 4 – снижение. В группе сравнения увеличение показателя SpO_2 наблюдалось у 1 пациента, без изменений – у 1 человека, у 7 лиц – снижение SpO_2 после лечения ($p_{\text{Fisher}} = 0,001$).

Через 3–6 мес. после выписки из стационара медиана показателя SpO_2 в основной группе составляла 96 [92; 97] %, при этом повышение SpO_2 было статистически значимым ($p_{\text{Wilcoxon}} = 0,02$). В группе сравнения в контрольные сроки медиана SpO_2 составляла 90 [88; 92] % ($p_{\text{Wilcoxon}} = 0,02$). Различия в группах сравнения по показателям SpO_2 были статистически значимыми ($p_{\text{Mann-Whitney}} = 0,0035$) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Изменение показателей кислородного насыщения крови (SpO_2) у пациентов до и после лечения, %

Table 2. Changes in the blood oxygen saturation indicators (SpO_2) in patients before and after treatment, %

Основная группа		Группа сравнения		$p_{\text{Mann-Whitney}}$
До лечения	Через 3–6 мес. после лечения	До лечения	Через 3–6 мес. после лечения	
93 [91; 96]	96 [92; 97]	90 [51; 93]	90 [88; 92]	0,0035

Среди пациентов основной группы хронические раны зажили у 4 из 7, у 2 – остались без изменений, у 1 – прогрессировали, что привело к ампутации конечности. Среди лиц группы сравнения у 4 из 8 пациентов трофические нарушения остались без изменений, у 4 – прогрессировали и привели к ампутации конечности ($p_{\text{Fisher}} = 0,02$).

Результаты лечения представлены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты лечения пациентов

Table 3. Patient treatment results

Показатель	Основная группа (n = 20)	Группа сравнения (n = 16)	p
К-во пациентов с сохраненными конечностями	18	10	$p_{\text{Cox-Mantel}} = 0,015$
Умерло	1	2	
Ампутировано конечностей	1	4	
Стадия ХАН	Уменьшилась – 15, без изменений – 3	Уменьшилась – 0, без изменений – 10	$p_{\text{Fisher}} = 0,0001$
Трофические нарушения	Зажили – 4, без изменений – 2, прогрессировали – 1	Зажили – 0, без изменений – 4, прогрессировали – 4	$p_{\text{Fisher}} = 0,02$

Заключение. Таким образом, включение РАМТ в комплексное лечение пациентов с диабетической ангиопатией нижних конечностей способствует сохранению нижней конечности, а также купированию признаков критической ишемии. Это подтверждается увеличением значения насыщения кислородом артериального гемоглобина конечности, увеличением дистанции безболевого ходьбы, а также заживлением хронических ран.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Towards reaching the target: clinical application of mesenchymal stem cells for diabetic foot ulcers / S. N. Dash [et al.] // *Rejuven. Res.* – 2014. – Vol. 17, N 1. – P. 40–53. <https://doi.org/10.1089/rej.2013.146>
2. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей [Электронный ресурс]. – Режим доступа : http://www.angiolsurgery.org/library/recommendations/2019/recommendations_LLA_2019.pdf. – Дата доступа : 30.05.2020.
3. Клинические рекомендации по диагностике и лечению синдрома диабетической стопы / Г. Р. Галстян [и др.] // *Раны и раневые инфекции. Журн. им. проф. Б. М. Костюченко.* – 2015. – Т. 2, № 3. – С. 63–83.
4. Клинические рекомендации по диагностике и лечению синдрома диабетической стопы [Электронный ресурс]. – Режим доступа : https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/specialists/science/clinic-recomendations/rec_sindr_diab_stop_2015.pdf. – Дата доступа : 30.05.2020.
5. 2017 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for vascular surgery (ESVS) / V. Aboyans [et al.] // *Eur. J. Endovasc. Surg.* – 2018. – Vol. 55. – P. 305–368.
6. 2017 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for vascular surgery (ESVS) – Web Addenda / V. Aboyans [et al.] // *Eur. J. Endovasc. Surg.* – 2017. – P. 1–22.
7. Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia / M. S. Conte [et al.] // *Eur. J. Endovasc. Surg.* – 2019. – Vol. 58, N 1S. – P. S1–S109e33. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.05.006>
8. Outcomes of critical limb ischemia in an urban, safety net hospital population with high Wifi amputation scores / R. Ward [et al.] // *Ann. Vasc. Surg.* – 2017. – Vol. 38. – P. 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2016.08.005>
9. Использование клеточных технологий при лечении хронической ишемии нижних конечностей / Р. В. Салютин [и др.] // *Укр. мед. часопис.* – 2013. – № 4. – С. 27–29.
10. 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. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial / E. Tateishi-Yuyama [et al.] // *Lancet.* – 2002. – Vol. 360, N 9331. – P. 428–435. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09670-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09670-8)
12. Adipose stromal vascular fraction improves cardiac function in chronic myocardial infarction through differentiation and paracrine activity / M. Mazo [et al.] // *Cell Transplant.* – 2012. – Vol. 21, N 5. – P. 1023–1037. <https://doi.org/10.3727/096368911x623862>
13. Outgrowth endothelial cells: characterization and their potential for reversing ischemic retinopathy / R. J. Medina [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2010. – Vol. 51, N 11. – P. 5906–5913. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4951>
14. Treatment of Moyamoya disease by multipoint skull drilling for indirect revascularization combined with mobilization of autologous bone marrow stem cells / R. Wu [et al.] // *Genet. Mol. Res.* – 2015. – Vol. 14, N 3. – P. 7519–7528. <https://doi.org/10.4238/2015.july.3.27>
15. Клеточные технологии в лечении терминальной стадии хронической ишемии нижних конечностей / А. Б. Смолянинов [и др.] // *Клет. трансплантол. и ткан. инженерия.* – 2007. – Т. 2, № 3. – С. 40–46.
16. Каргин, В. Д. Терапевтический ангиогенез в лечении хронической ишемии конечностей / В. Д. Каргин // *Стоматология.* – 2013. – Т. 14. – С. 135–147.

17. Орехов, П. Ю. Биологические аспекты и клиническое применение стволовых клеток при критической ишемии нижних конечностей / П. Ю. Орехов, А. В. Троицкий, А. В. Чупин // *Ангиология и сосуд. хирургия*. – 2018. – Т. 24, № 2. – С. 19–30.
18. Коцлова, А. А. Состояние регионарного кровообращения и микроциркуляции у пациентов с синдромом диабетической стопы при лечении методами клеточной и генной терапии / А. А. Коцлова, Т. Д. Власов, В. В. Давыденко // *Науч.-исслед. публикации*. – 2015. – № 11. – С. 55–59.
19. Lasala, G. P. Therapeutic angiogenesis in patients with severe limb ischemia by transplantation of a combination of stem cell product / G. P. Lasala, J. A. Silva, J. J. Minguell // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2012. – Vol. 144, N 2. – P. 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.08.053>
20. Fadini, G. P. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature / G. P. Fadini, C. Agostini, A. Avorago // *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 209, N 1. – P. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.033>
21. Щербачева, Т. Н. Инновационные клеточные технологии с позиций доказательной медицины / Т. Н. Щербачева, А. И. Еремина, М. А. Второва // *Фармация и фармакология*. – 2015. – Т. 3. – С. 69–71.
22. Руководство ВОЗ по пульсоксиметрии [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.childrenshospice.ru/wp-content/uploads/2016/05/WHO-Pulse-Oximetry-Training-Manual-Final-Russian.pdf>. – Дата доступа : 20.10.2018.

References

1. Dash S. N., Dash N. R., Guru B., Mphapatra P. C. Towards Reaching the Target: Clinical application of mesenchymal stem cells for diabetic foot ulcers. *Rejuvenation Research*, 2014, vol. 17, no. 1, pp. 40–53. <https://doi.org/10.1089/rej.2013.146>
2. *National guidelines for the management of patients with lower limb artery disease*. Available at : http://www.angiolsurgery.org/library/recommendations/2019/recommendations_LLA_2019 (accessed 30.05.2020) (in Russian).
3. Galstyan G. R., Tokmakova A. Yu., Egorova D. N., Mitish V. A., Paskhalova Yu. S., Antsiferov M. B. [et al.]. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of diabetic foot syndrome. *Rany i ranevye infektsii. Zhurnal imeni professora B. M. Kostyuchenka* [Wounds and wound infections. Journal named after professor B. M. Kostyuchenok], 2015, vol. 2, no. 3, pp. 63–83 (in Russian).
4. *Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of diabetic foot syndrome*. Available at : https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/specialists/science/clinic-recomendations/rec_sindr_diab_stop_2015.pdf. (accessed 30.05.2020) (in Russian).
5. Aboyans V., Ricco J.-B., Bartelink M.-L. E. L., Björck M., Brodmann M., Cohnert T. [et al.]. 2017 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for vascular surgery (ESVS). *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2018, vol. 55, pp. 305–368.
6. Aboyans V., Ricco J.-B., Bartelink M.-L. E. L., Björck M., Brodmann M., Cohnert T. [et al.]. 2017 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for vascular surgery (ESVS) – Web Addenda. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2017, pp. 1–22.
7. Conte M. S., Bradbury A. W., Kolh Ph. Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2019, vol. 58, no. 1S, pp. S1–S109e33. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.05.006>
8. Ward R., Dunn J., Clavijo L., Shavelle D., Rowe V., Woo K. Outcomes of critical limb ischemia in an urban, safety net hospital population with high Wifi amputation scores. *Annals of Vascular Surgery*, 2017, vol. 38, pp. 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2016.08.005>
9. Salyutin R. V., Buslovich O. V., Sirman V. M., Boris R. M., Komarova L. S., Palyanitsya S. S. The use of cell technologies in the treatment of chronic lower limb ischemia. *Ukrains'kii medichnii chasopis* [Ukrainian medical journal], 2013, no. 4, pp. 27–29 (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. Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U., Shintani S., Masaki H. [et al.]. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, vol. 360, no. 9331, pp. 428–435. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09670-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09670-8)
12. Mazo M., Cemborain A., Gavira J. J., Abizanda G., Arana M., Casado M. [et al.]. Adipose stromal vascular fraction improves cardiac function in chronic myocardial infarction through differentiation and paracrine activity. *Cell Transplantation*, 2012, vol. 21, no. 5, pp. 1023–1037. <https://doi.org/10.3727/096368911x623862>
13. Medina R. J., O'Neill Ch. L., Humphreys M. W., Gardiner T. A., Stitt A. W. Outgrowth endothelial cells: characterization and their potential for reversing ischemic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2010, vol. 51, no. 11, pp. 5906–5913. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4951>
14. Wu R., Su N., Zhang Z., Jia F. Treatment of moyamoya disease by multipoint skull drilling for indirect revascularization combined with mobilization of autologous bone marrow stem cells. *Genetics and Molecular Research*, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 7519–7528. <https://doi.org/10.4238/2015.july.3.27>
15. Smolyaninov A. B., Pykhtin E. V., Bulgin D. V., Tomonaga M. Cellular technologies in the treatment of the terminal stage of chronic lower limb ischemia. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya* [Cell transplantation and tissue engineering], 2007, vol. 2, no. 3, pp. 40–46 (in Russian).

16. Kargin V. D. Therapeutic angiogenesis in the treatment of chronic limb ischemia. *Stomatologiya* [Dentistry], 2013, vol. 14, pp. 135–147 (in Russian).
17. Orekhov P. Yu., Troitskii A. V., Chupin A. V. Biological aspects and clinical use of stem cells in critical lower limb ischemia. *Angiologiya i sosednaya khirurgiya* [Angiology and vascular surgery], 2018, vol. 24, no. 2, pp. 19–30 (in Russian).
18. Kotslova A. A., Vlaso T. D., Davydenko V. V. The state of regional blood circulation and microcirculation in patients with diabetic foot syndrome treated with cell and gene therapy. *Nauchno-issledovatel'skie publikatsii* [Research publications], 2015, no. 11, pp. 55–59 (in Russian).
19. Lasala G. P., Silva J. A., Minguell J. J. Therapeutic angiogenesis in patients with severe limb ischemia by transplantation of a combination of stem cell product. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2012, vol. 144, no. 2, pp. 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.08.053>
20. Fadini G. P., Agostini C., Avorago A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis*, 2010, vol. 209, no. 1, pp. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.033>
21. Shcherbakova T. N., Eremina A. I., Vtorova M. A. Innovative cell technologies from the standpoint of evidence-based medicine. *Farmatsiya i farmakologiya* [Pharmacy and pharmacology], 2015, vol. 3, pp. 69–71 (in Russian).
22. *WHO manual on pulse oximetry*. Available at: <http://www.childrenshospice.ru/wp-content/uploads/2016/05/WHO-Pulse-Oximetry-Training-Manual-Final-Russian.pdf>. (accessed 20.10.2018) (in Russian).

Информация об авторах

Камендровская Алина Анатольевна – ассистент. Витебский государственный медицинский университет (ул. Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь). E-mail: kamendroshka@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2089-7201>

Федянин Сергей Дмитриевич – канд. мед. наук, доцент. Витебский государственный медицинский университет (ул. Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь). E-mail: fedyanin-1977@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9175-2109>

Коваленко Андрей Александрович – канд. мед. наук, доцент. Витебский государственный медицинский университет (ул. Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь). E-mail: andrej.kovalenko.1966@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-8435-1291>

Ратомский Юрий Иванович – заведующий отделением. Витебская городская центральная клиническая больница (ул. Максима Горького, 90-а, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь). E-mail: elena.ratomskaya@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-1175-3193>

Information about the authors

Alina A. Kamiandrouskaya – Assistant. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Str., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: kamendroshka@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2089-7201>

Siarhey D. Fedzyanin – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Str., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: fedyanin-1977@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9175-2109>

Andrey A. Kovalenko – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Str., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: andrej.kovalenko.1966@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-8435-1291>

Yury I. Ratomski – Head of the Department. Vitebsk City Central Clinical Hospital (90-a, Maksim Gorky Str., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: elena.ratomskaya@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-1175-3193>