

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

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2024. Т. 21, № 4

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2024. Т. 21, № 4

Журнал основан в 2004 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

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

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

Главный редактор

Василий Генрихович Богдан –

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
- 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
- Р. Р. Сидорович** – Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Республика Беларусь
- А. В. Строчкий** – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
- Д. В. Тапальский** – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- Л. П. Титов** – Республиканский научно-практический центр микробиологии и эпидемиологии, Минск, Республика Беларусь

Редакционный совет

- Эдуардас Алекнавичюс** – Национальный институт рака, Вильнюс, Литовская Республика
- 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
- 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. 2024. Том 21, № 4
Выходит на русском, белорусском и английском языках

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

Подписано в печать 11.11.2024. Выход в свет 27.11.2024. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 40 экз. Заказ 230.
Цена номера: индивидуальная подписка – 14,01 руб., ведомственная подписка – 32,74 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, 220084, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,
Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук, 2024

PROCEEDINGS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICAL SERIES, 2024, vol. 21, no. 4

The Journal was founded in 2004

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

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

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

Vasily G. Bogdan –

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 (*Leading 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 for Pulmonology and Tuberculosis, Minsk,
Republic of Belarus

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

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

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

Natalia P. Mitkovskaya – Republican Scientific and Practical Centre of 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

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

Alexandr V. Strotsky – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Dmitry V. Tapalsky – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic
of Belarus

Leonid P. Titov – Republican Scientific and Practical Centre of Microbiology and Epidemiology, 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

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

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, 2024, vol. 21, no. 4.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*

Computer imposition *L. I. Kudzerko*

It is sent of the press 11.11.2024. Appearance 27.11.2024. Format 60×84¹/₈. Offset paper. The press digital.

Printed pages 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 40 copies. Order 230.

Number price: individual subscription – 14.01 byn., departmental subscription – 32.74 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka"

Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer, distributor of printing editions

No. 1/18 dated August 2, 2013. License for the press No. 02330/455 dated December 30, 2013.

Address: 40, F. Scorina Str., Minsk, 220084, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series, 2024

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

ЗМЕСТ

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Демиденко М. И., Жаворонок И. П., Адамчук Д. В., Кулагова Т. А., Антипова О. А., Басалай А. А., Кузнецова Т. Е., Максименко С. А. Биосовместимость легированного бором пиролитического углерода.....	271
Чепелева Е. Н., Висмонт Ф. И. Значимость активности аргиназы печени в процессах детоксикации, формировании тиреоидного статуса и дислипидемии у крыс с экспериментальным перитонитом	282
Матиевская Н. В., Кузнецова Е. В., Морозик П. М., Козловский В. И., Горчакова О. В. Ассоциация полиморфизма генов, кодирующих ренин-ангиотензиновую систему, и гена <i>LZTFL1</i> с тяжестью течения SARS-CoV-2.....	294
Жуковская С. В., Можейко Л. Ф. Эффективность экстракорпорального оплодотворения при бесплодии у женщин с эутиреоидным статусом.....	305
Ходулев В. И., Кобылко О. В., Ковалев А. А. Электронейромиографическая характеристика поздних ответов при радикулопатии S1	316
Шевела Т. Л., Костюк С. А., Белый М. Г. Обоснование выбора метода подготовки костного ложа при непосредственной дентальной имплантации.....	326
Жабинская А. А., Мелик-Касумов Т. Б., Пыж А. Э. Особенности возрастных изменений кишечной микробиоты крыс линии Wistar при действии антибиотиков и пребиотика 2'-фукозиллактозы	334
Рашкевич О. С., Волчек А. В. Антигипоксический эффект комбинации бемитила и тимохинона в условиях гиперкапнической гипоксии.....	345

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

CONTENTS

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

Demidenko M. I., Zhavoronok I. P., Adamchuk D. V., Kulahava T. A., Antipova O. A., Basalai A. A., Kuznetsova T. E., Maksimenko S. A. Biocompatibility of boron-enriched pyrolytic carbon	271
Chepeleva E. N., Vismont F. I. Significance of the liver arginase activity in the processes of detoxification, formation of thyroid status and dyslipidemia in rats with experimental peritonitis	282
Matsiyevskaya N. V., Kuzniatsova K. U., Marozik P. M., Kozlovski V. I., Harchakova V. U. Association of the polymorphism of the genes coding the renin-angiotensin system and the <i>LZTFL1</i> gene with the severity and outcomes of SARS-CoV-2 infection.....	294
Zhukovskaya S. V., Mozhejko L. F. Effectiveness of <i>in vitro</i> fertilization for infertility in women with euthyroid status	305
Khodulev V. I., Kabyłka A. V., Kovalev A. A. Characteristics of late responses in S1 radiculopathy	316
Shevela T. L., Kostiuik S. A., Bely M. G. Justifying the method chosen for bone bed preparation for immediate dental implantation	326
Zhabinskaya A. A., Melik-Kasumov T. B., Pyzh H. E. Age-related features of the intestinal microbiota changes in Wistar rat pups after application of antibiotics and prebiotic 2'-fucosyllactose	334
Rashkevich O. S., Vauchok A. U. Antihypoxic effect of a combination of bemethyl and thymoquinone under hypercapnic hypoxia	345

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

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 616-77+57(043+089.6):620.11:661.78+616-092.9
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-271-281>

Поступила в редакцию 22.06.2023
Received 22.06.2023

М. И. Демиденко¹, И. П. Жаворонок², Д. В. Адамчук¹, Т. А. Кулагова¹,
О. А. Антипова², А. А. Басалай², Т. Е. Кузнецова², С. А. Максименко¹

¹Институт ядерных проблем БГУ, Минск, Республика Беларусь

²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ЛЕГИРОВАННОГО БОРОМ ПИРОЛИТИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА

Аннотация. В НИИ ядерных проблем БГУ (НИИ ЯП БГУ) разработана установка и оптимизирована технология синтеза легированного бором пироуглерода – материала, используемого в конструкциях эндопротезов клапанов сердца.

Цель настоящей работы – оценка общего и биохимического анализа крови, массовых коэффициентов органов животных и динамики реакций тканей крыс на имплантацию пироуглеродного материала в подкожные ткани межлопаточной области.

Мониторинг показателей животных осуществляли в течение 90 сут. По данным морфометрического исследования, во все сроки наблюдения синтезированный в НИИ ЯП БГУ пироуглерод, легированный бором, видимо, не оказывает раздражающего действия на ткани по сравнению с контрольным образцом. Не выявлено существенно влияния имплантации образцов материала из пиролитического углерода на изучаемые параметры общего и биохимического анализа крови крыс по сравнению со здоровыми животными. По результатам проведенной некропсии установлено, что в разные сроки после имплантации животным материала из пиролитического углерода показатели массы и массовых коэффициентов органов животных не выходят за пределы физиологической нормы.

Таким образом, легированный бором пироуглеродный материал по характеристикам биосовместимости может быть использован для изготовления эндопротезов клапанов сердца.

Ключевые слова: пиролитический углерод, эндопротез клапана сердца, имплантат, биосовместимость

Для цитирования: Биосовместимость легированного бором пиролитического углерода / М. И. Демиденко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 4. – С. 271–281. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-271-281>

Marina I. Demidenko¹, Irina P. Zhavoronok², Dmitry V. Adamchuk¹, Tatsiana A. Kulahava¹,
Olga A. Antipova², Anastasia A. Basalai², Tatyana E. Kuznetsova², Sergey A. Maksimenko¹

¹Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

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

BIOCOMPATIBILITY OF BORON-ENRICHED PYROLITIC CARBON

Abstract. The Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University (INP BSU) has developed equipment and optimized the technology for synthesizing boron-doped pyrocarbon, a material for application in heart valve endoprostheses.

The purpose of this work was to evaluate the general and biochemical blood tests, mass coefficients of animal organs and the dynamics of reactions of rat tissues to implantation of pyrocarbon material in the subcutaneous tissues of the inter-scapular region.

Animals were monitored for 90 days. According to the morphometric data, the boron-doped pyrocarbon, synthesized in INP BSU, was found to be non-irritating to the tissue in comparison with the control sample during all periods of observation. There was no significant effect of implantation of pyrolytic carbon on the parameters of the blood general and biochemical analysis in rats compared with healthy animals. The results of necropsy showed that the mass of organs and mass coefficients of animals did not deviate from the physiological norm during different periods of pyrocarbon sample implantation.

Thus, the boron-doped pyrocarbon material synthesized in INP BSU can be used for manufacturing heart valve endoprostheses.

Keywords: pyrolytic carbon, heart valve endoprosthesis, implant, biocompatibility

For citation: Demidenko M. I., Zhavoronok I. P., Adamchuk D. V., Kulahava T. A., Antipova O. A., Basalai A. A., Kuznetsova T. E., Maksimenko S. A. Biocompatibility of boron-enriched pyrolytic carbon. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 4, pp. 271–000 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-271-281>

Введение. Углеродные композиционные материалы обладают хорошими прочностными, электрическими, оптическими свойствами и одновременно высокой биосовместимостью с тканями организма. Одним из перспективных углеродных материалов является пиролитический углерод (пироуглерод) – поликристаллическая форма углерода, образованная ориентированными произвольным или упорядоченным образом микроразмерными чешуйками графита [1, 2]. Такая структура обеспечивает отличие тепловых, электрических и механических свойств пироуглерода от графита. При этом пироуглерод является гемосовместимым – не вызывает гемолиз и тромбообразование, не изменяет свойства под воздействием биологических сред, не подвергается коррозии и усталостным напряжениям [1–4]. Сочетание физико-механических свойств, необходимых для долгосрочного использования, и биосовместимых качеств углеродного материала позволило применить его для изготовления механических искусственных сердечных клапанов [1–7]. Компоненты пиролитического углерода использовались более чем в 25 различных конструкциях протезов сердечных клапанов с конца 1960-х годов. Накоплен клинический опыт порядка 16 млн пациенто-лет [1].

С 1990-х годов пироуглерод стали применять и для изготовления костных протезов [8]. Углеродсодержащие имплантаты по своим характеристикам близки к костной ткани, инертны, обладают osteoconductive свойствами, которые позволяют формировать костно-углеродный блок при условии высокой пористости применяемых имплантатов [8–10]. Показано, что трибологические свойства пироуглерода наиболее близки к здоровому тазобедренному суставу человека и превосходят современные материалы, применяемые в парах трения эндопротезов тазобедренного сустава [11, 12]. Выявлено, что в прилегающем к имплантатам из пиролитического углерода хряще и поблизости от них отмечается меньшая дегенерация, чем у имплантатов из сплава Co-Cr, в медиальном мышечке бедра во все периоды оценки в течение года. Зарегистрировано меньше износа, дегенерации и клеточных изменений поверхности большеберцового хряща при применении имплантатов из пиролитического углерода [3].

В настоящее время использование пироуглерода существенно расширяется, что требует оптимизации методики его синтеза и разработки материала с улучшенными характеристиками.

В НИИ ядерных проблем БГУ (НИИ ЯП БГУ) разработана установка и оптимизирована технология синтеза легированного бором пироуглеродного материала методом химического осаждения из газовой фазы (CVD) [13, 14]. Технология CVD является перспективной для изготовления углерод-углеродных композитов, которая используется достаточно длительное время. Установка представляет собой нагреваемую до 1 400–1 500 °С цилиндрическую графитовую сборку, через которую пропускается смесь газов. В процессе эксплуатации установки отработаны методические подходы, обеспечивающие синтез однородного легированного бором пиролитического углерода. В качестве углерод-содержащих газов используются метан и пропан-бутановая смесь, последняя позволяет существенно увеличить скорость осаждения и формирования материала в реакторе в процессе пиролиза. Источником бора является газообразное соединение BCl_3 , которое в горячем реакторе распадается на отдельные атомы бора, которые вступают в реакцию с активным углеродом с образованием карбида бора, обладающего высокими прочностными характеристиками. Одной из существенных проблем, возникающих в процессе разложения углеводородных газов, является образование большого количества атомарного водорода, который, реагируя с хлором, образует кислоту. Для уменьшения концентрации опасных паров в реакционной камере добавляют газообразный азот, который также стабилизирует структуру осаждаемого пироуглеродного материала. Следует отметить, что данная установка требовательна к вакууму, поскольку любая течь приводит к поступлению кислорода из атмосферы и образованию реакционных паров, способных разрушать материал камеры. Варьирование технологических параметров (расход газа, температура и давление в реакционной камере) позволяет синтезировать материал с высокими прочностными характеристиками – от 50 до 140 HRC [13, 14].

Поскольку пироуглерод планируется использовать для конструкций сердечных клапанов, важным этапом является оценка биосовместимости данного материала [15].

Целью настоящей работы являлась оценка общего и биохимического анализа крови, массовых коэффициентов органов животных и динамики реакций тканей крыс на имплантацию материала, предназначенного для изготовления эндопротезов клапанов сердца, производства Республики Беларусь.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись экспериментальные образцы материала для изготовления эндопротезов клапанов сердца (ЭКС) производства Республики Беларусь – углерод пиролизический в форме пластин ТУ ВУ 100074444.013-2021 (ЭОУП) и контрольные образцы материала для изготовления ЭКС производства Российской Федерации – углеситалл марки УСБ ТУ-9494-001-476003303 (КОУ).

Исследование проведено на самцах крыс линии Вистар массой 200–220 г (на момент их размещения в карантин), без признаков патологии ($n = 45$). Крыс содержали в виварии при стандартных условиях и доступе к воде и пище *ad libitum* [16]. Протокол исследования (№ 4 от 07 июля 2022 г.) одобрен комиссией по биоэтике ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси». Перед экспериментом за животными наблюдали в течение 7 сут. Для эксперимента отобрали 45 активных крыс с гладким, блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, охотно поедающих корм. Животные были разделены на три группы (группа 1 – ложнооперированные, группа 2 – с ЭОУП, группа 3 – с КОУ), и каждому животному был присвоен индивидуальный номер [17, 18]. Программа исследований включала: имплантацию образцов, оценку на 30, 60 и 90-е сутки после операции показателей общего и биохимического анализа крови, некропсию с определением массовых коэффициентов внутренних органов и гистологической картины окружающих имплантаты тканей.

Операцию по имплантации проводили в операционном блоке вивария под общим наркозом (введение в боковую вену хвоста тиопентала натрия в дозе 30 мг/кг). После удаления шерстного покрова область операционного поля обрабатывали 5%-м спиртовым раствором йода. Разрез кожи производили брюшистым скальпелем. Образцы ЭОУП и КОУ размером 1 см² округлой формы имплантировали под кожу спины. Одному животному имплантировали только 1 образец. Кожную рану ушивали непрерывным швом. Шов обрабатывали 1%-м раствором бриллиантовой зелени. В группе ложнооперированных животных проводили операцию без имплантации. До выхода из наркоза животные находились под визуальным наблюдением. Для предупреждения развития инфекции животным инъецировали Байтрил (2,5%-й раствор для инъекций) 12,5 мг/кг однократно на протяжении 3 сут.

На 30, 60 и 90-е сутки исследования животных подвергали эвтаназии (тиопентал натрия – 100 мг/кг) и некропсии, определяли массовые коэффициенты органов (сердца, легкого, печени, селезенки, почек, надпочечников, тимуса) и производили забор биопсийного материала. Массовый коэффициент, как достоверный критерий, характеризующий патологические изменения в больном органе и организме в целом, определяли как отношение массы органа в граммах к массе тела животного в граммах [19]. Для гистологического исследования образцы иссекали единым блоком с окружающими тканями. После быстрой заморозки объекты помещали на криостатные блоки и изготавливали срезы толщиной 7 мкм на микротоме-криостате НМ-525 (Microm, Германия). Криостатные срезы подсушивали на воздухе в течение 2–5 мин, затем фиксировали в охлажденном 70%-м спирте и окрашивали гематоксилин-эозином. Для исследования микропрепаратов и изготовления микрофотографий использовали световой микроскоп «Альтами LUM-1», оснащенный цифровой фотокамерой. Исследование тканей проводили при 40-, 100- и 400-кратном увеличении микроскопа. На микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, оценивали общую гистологическую картину в зоне имплантации и клеточный состав, проводили морфометрическую оценку клеточной и тканевой реакции на имплантацию углеродного материала в соответствии с рекомендациями, изложенными в ГОСТ ISO 10993-6-2011 [20]. Состав и количество клеток инфильтрата, окружающего имплантат, оценивали на микрофотографиях ($\times 400$), сделанных не менее чем в 8 произвольно выбранных непересекающихся полях зрения.

Забор крови осуществляли из латеральной вены хвоста крыс. Общий анализ крови проводили с использованием автоматического гематологического ветеринарного анализатора Nihon

МЕК 6450К (Япония). Определяли количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина и гематокрит, эритроцитарные индексы. Биохимический анализ проводили с помощью биохимического анализатора BS-200 (MINDRAY, Китай) с программным обеспечением BS-330, используя коммерческие наборы фирмы «Диасенс» (Беларусь).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета Microsoft Excel (Microsoft Corp., США). Уровень статистической значимости различий был принят равным 0,05. Результаты количественных измерений представлены в виде $M \pm m$ (где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего) или в виде $Me [25; 75]$ (где Me – медиана, 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-го и 75-го перцентилей). Для сравнения полученных данных применяли непараметрический U -критерий Манна–Уитни. При обработке данных биохимического анализа использовали критерий Краскела–Уоллиса.

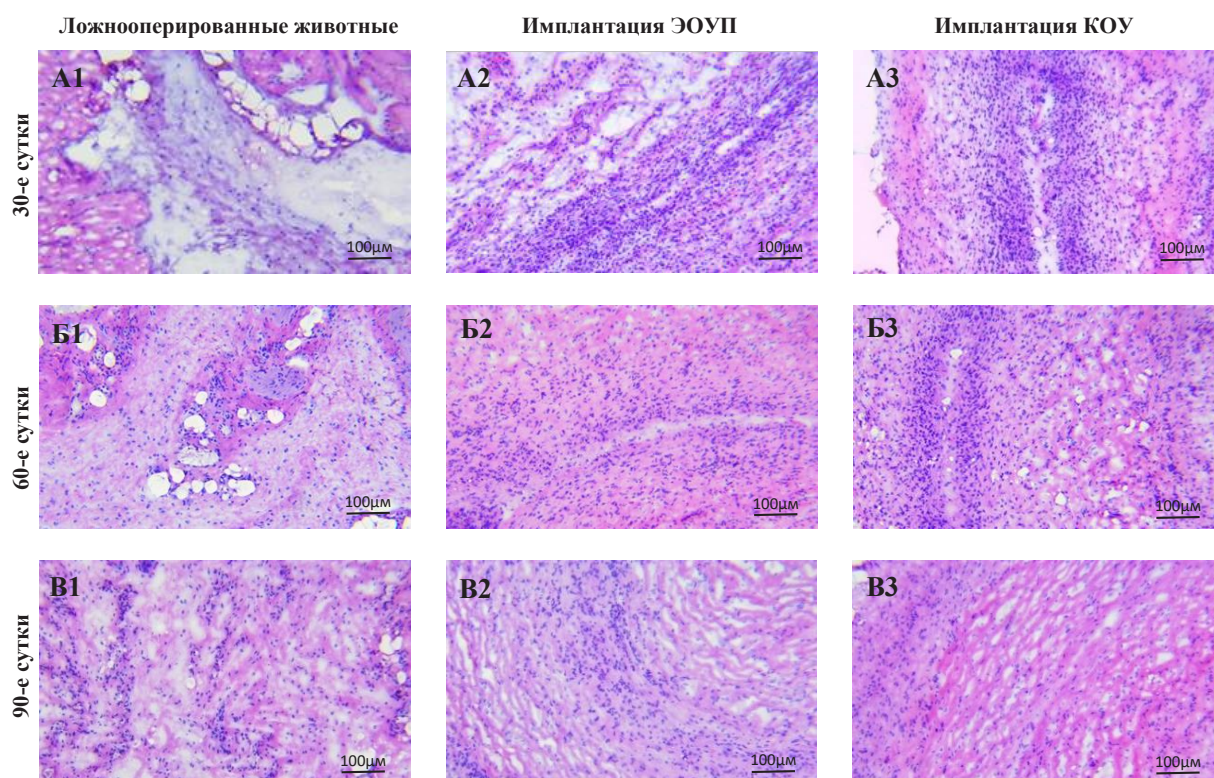
Результаты и их обсуждение. Одним из этапов оценки биосовместимости новых биомедицинских материалов является исследование их местного и системного действия после имплантации лабораторным животным. Как правило, местное действие оценивают, сравнивая реакцию ткани, вызванную применением исследуемого материала, с аналогичной реакцией контрольных образцов из используемых в медицинских изделиях материалов, биологическая безопасность и возможность клинического применения которых ранее установлена. Поэтому нами проведены сравнительные исследования местного и системного действия экспериментальных образцов материала для изготовления ЭКС производства Республики Беларусь – ЭОУП и контрольных образцов материала производства Российской Федерации – КОУ после их имплантации крысам линии Вистар. При этом оценивали физиологические параметры лабораторных животных – массовые коэффициенты внутренних органов и показатели общего и биохимического анализа крови, а также гистологическую картину окружающих имплантаты тканей на 30, 60 и 90-е сутки после операции. Поскольку местная биологическая реакция тканей на имплантируемый материал зависит как от свойств материала, так и от травмы, вызванной хирургическим вмешательством, проведено сравнение с ложнооперированными животными.

Выявлено, что во все сроки эксперимента ЭОУП и КОУ легко обнаруживались в месте имплантации, не подвергались биодеградации. При проведении гистологического исследования в окрашенных гематоксилином и эозином микропрепаратах ткани, окружающей ЭОУП или КОУ, оценивали общую картину в зоне имплантации и клеточный состав. На рисунке представлены типичные образцы гистологических срезов на 30, 60 и 90-е сутки после операций.

Известно, что за время, прошедшее после имплантации, конфигурация ткани вокруг имплантата изменяется. В течение первых 2 недель после имплантации реакция тканей обусловлена самой процедурой хирургического вмешательства, которую трудно отделить от реакции на имплантируемый материал. Нами установлено, что у ложнооперированных крыс уже на 30-е сутки определяется нормальное строение подкожных тканей. Дерма состоит из плотной неоформленной соединительной ткани, в которой располагаются многочисленные кровеносные сосуды и нервы. В гиподерме выявляется жировая ткань с участками соединительной ткани и мышечными волокнами. В образцах встречались немногочисленные клетки воспалительного инфильтрата, тучные клетки и эозинофилы.

На 30-е сутки в зоне имплантации как ЭОУП (рисунок, А2), так и КОУ (рисунок, А3) наблюдается плотная неоформленная соединительная ткань без признаков отека, с большим количеством фибробластов и коллагеновых волокон. Лимфогистиоцитарная и макрофагальная инфильтрация выражена умеренно. Тучные клетки и эозинофилы выявлялись на отдельных участках. В непосредственной близости от ЭОУП отмечались единичные новообразованные кровеносные сосуды. Определялось минимальное количество жировых инфильтратов, связанных с фиброзом. Аналогичная картина наблюдалась у крыс с КОУ.

На 60-е и 90-е сутки у ложнооперированных крыс (рисунок, Б1 и В1) определялась картина, характерная для нормального строения подкожных тканей. Дерма состояла из плотной неоформленной соединительной ткани. В ней располагались многочисленные кровеносные сосуды и нервы. В гиподерме выявлялась жировая ткань с участками соединительной ткани и мышечными волокнами. Встречались немногочисленные клетки воспалительного инфильтрата. В этот же



Микроскопическая картина подкожных тканей у ложнооперированных животных и у крыс после имплантации экспериментального и контрольного образцов материалов пиролизического углерода на 30, 60 и 90-е сутки.

Окраска: гематоксилин-эозин

Microscopic picture of subcutaneous tissues in sham operated rats and rats after implantation of experimental and control pyrolytic carbon samples on the 30th, 60th and 90th days. Stain: hematoxylin-eosin

период вблизи ЭОУП (рисунок, В2) наблюдалась плотная неоформленная соединительная ткань без признаков отека, с большим количеством фибробластов и коллагеновых волокон, за которой располагалась узкая полоса оформленной соединительной ткани (рубец). Через 90 сут полоса рубцовой соединительной ткани увеличивалась (уширялась). Это обусловлено тем, что слой фиброзной ткани стремится отделить остальные ткани от имплантированного материала. Такие реакции наблюдаются при использовании твердых материалов: политетрафторэтилена, полиметилметакрилата, полиэтилена, полипропилена, полисилоксана.

На 60-е и 90-е сутки лимфогистиоцитарная и макрофагальная инфильтрация была выражена умеренно. Тучные клетки и эозинофилы выявлялись на отдельных участках. В непосредственной близости от ЭОУП выявлялись немногочисленные новообразованные кровеносные сосуды. Определялось минимальное количество жировых инфильтратов, связанных с фиброзом. На 90-е сутки вблизи ЭОУП иногда наблюдался минимальный некроз тканей. Характеристика и динамика реакции ткани на ЭОУП не отличалась от таковой для КОУ.

В табл. 1 представлены данные морфометрической оценки клеточной и тканевой реакции на имплантацию образцов на 30, 60 и 90-е сутки в соответствии с рекомендациями, изложенными в ГОСТ ISO 10993-6-2011. Представлены средние значения в группах из 5 лабораторных животных, а также средний показатель степени раздражителя для каждого образца в разные временные интервалы. Видно, что экспериментальный и контрольный образцы являются легкими раздражителями для животных (по сравнению с ложнооперированными), поскольку разница средних показателей в группах ЭОУП-ложнооперированные и КОУ-ложнооперированные находится в интервале от 3,0 до 8,9. В то же время разница показателей между ЭОУП и КОУ составляет менее 3,0, что свидетельствует о нераздражающем свойстве синтезированного нами образца ЭОУП относительно ткани лабораторного животного по сравнению с КОУ.

Таблица 1. Сравнительная полуквантитативная оценка (характеристика и динамика реакции тканей) ответной реакции подкожных тканей крыс на имплантацию образцов пиролитического углерода для изготовления ЭКС

Table 1. Comparative semi-quantitative assessment (characteristics and dynamics of tissue response) of the response of subcutaneous rat tissues to the implantation of pyrolytic carbon samples for the manufacture of heart valve endoprostheses

Показатель	Ложнооперированные животные			ЭОУП			КОУ		
	Временной интервал после имплантации, сут								
	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Параметры воспаления:									
полиморфноядерные лейкоциты	1,2	1,6	1,2	1,2	1,6	0,8	1,4	1,4	1,4
лимфоциты	1	1,8	1	1,8	1,8	1	2	2	1,4
плазматические клетки	1	1	0,2	1	1	0,4	1	0,6	0
макрофаги	1	1,2	1	2	1	1	1,8	1,8	1,8
гигантские клетки	0	0	0	0,8	0	0,8	1	0,4	0,2
некроз	0	0	0	0	0,8	0,2	0	0,6	0,8
Промежуточный итог (×2)	8,4	11,2	6,8	13,6	12,4	8,4	14,4	13,6	11,2
Тканевая реакция:									
неоваскуляризация	0,8	0,6	0,8	0,4	1	1	1	1	1
фиброз	0	0	0	1	1,2	2	1	1,4	2,6
жировой инфильтрат	1,8	1,8	1,6	1	1,2	1	1	1,2	1
Промежуточный итог	2,4	2,4	2,4	2,4	3,4	4	3	3,6	4,6
Средний показатель степени раздражителя	10,8	13,6	9,2	16	15,8	12,4	17,4	17,2	15,8

Животным в разные сроки после имплантации образцов материалов либо после ложной операции (30, 60, 90-е сутки) был проведен общий и биохимический анализ крови. Усредненные по группам данные общего анализа крови представлены в табл. 2. Общий анализ крови не выявил статистически достоверных изменений [21] какого-либо из исследуемых показателей крови ни в одной из групп ни на одном из этапов исследования.

В сыворотке крови крыс трех экспериментальных групп определяли следующие биохимические показатели: концентрации мочевины и креатинина, а также активность ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ). Из представленных в табл. 3 данных видно, что на 30-е сутки после имплантации ЭОУП у крыс отмечается статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение активности АСТ в сыворотке крови по сравнению с таковой в группе животных с КОУ, но при этом не выявлено достоверных различий с группой ложнооперированных крыс, что позволяет предположить отсутствие влияния тестируемого образца на данный показатель. Других статистически значимых изменений исследуемых биохимических показателей в сыворотке крови на 30, 60 и 90-е сутки после имплантации/ложной операции не выявлено.

При проведении некропсии помимо забора тканей, окружающих имплантат, либо тканей с участка проведения ложной операции производили забор следующих органов для макроскопического исследования и определения массовых коэффициентов (МК): селезенки, надпочечников, тимуса, почек, печени, сердца и легких (табл. 4).

Макроскопический осмотр органов не выявил отклонений в их внешнем виде. Статистически достоверных изменений масс органов относительно ложнооперированных крыс и животных с имплантацией КОУ не выявлено ни на 30-е, ни на 60-е сутки исследования. На 90-е сутки после имплантации образцов КОУ у самцов-крыс наиболее чувствительным органом оказалась печень – отмечено снижение ее МК на 8,2 % по сравнению с МК ложнооперированных животных ($p = 0,032$) (табл. 4). Между группами животных с имплантированными образцами ЭОУП и КОУ, а также между ложнооперированными и ЭОУП статистически значимых изменений органов не выявлено ни в одной из временных точек.

Таблица 2. Основные показатели общего анализа крови крыс-самцов ложнопериорированных и после имплантации образцов пиролизического углерода для изготовления ЭКС
 Table 2. Main indicators of the general blood test of the sham operated male rats and after implantation of pyrolytic carbon samples for the manufacture of heart valve endoprosthesis

Показатель	Ложнопериорированные животные				ЭОУП				КОУ			
	Временной интервал после имплантации, сут											
	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	9,0 ± 1,4	13,3 ± 1,1	12,8 ± 1,0	9,6 ± 0,9	16,9 ± 0,9	11,7 ± 0,7	10,4 ± 1,0	16,3 ± 1,5	14,7 ± 0,8			
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	7,7 ± 0,2	8,5 ± 0,2	8,5 ± 0,3	7,9 ± 0,2	7,9 ± 0,3	8,4 ± 0,3	7,6 ± 0,2	8,3 ± 0,2	8,6 ± 0,1			
Гемоглобин, г/л	148,6 ± 2,2	151,4 ± 6,3	149,0 ± 3,4	155,0 ± 5,0	149,4 ± 5,8	156,8 ± 4,6	146,2 ± 1,6	154,0 ± 2,4	154,8 ± 2,5			
Гематокрит, %	43,1 ± 0,8	44,4 ± 1,8	43,0 ± 1,0	44,3 ± 1,4	43,2 ± 1,6	44,1 ± 1,5	41,6 ± 0,6	44,3 ± 0,7	43,7 ± 0,6			
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	711,8 ± 15,6	759,2 ± 52,0	817,2 ± 54,9	713,8 ± 16,3	629,6 ± 52,2	885,6 ± 32,6	796,0 ± 15,6	768,4 ± 28,1	799,0 ± 44,5			
MCV, фл	55,8 ± 1,7	52,2 ± 1,0	50,9 ± 0,9	55,8 ± 0,7	54,6 ± 1,1	52,4 ± 0,3	55,0 ± 0,7	53,2 ± 0,5	50,7 ± 0,4			
MCH, пг	19,3 ± 0,6	17,8 ± 0,4	17,6 ± 0,3	19,5 ± 0,2	18,0 ± 0,4	18,6 ± 0,2	19,3 ± 0,3	18,6 ± 0,2	18,0 ± 0,2			
MCHC, г/л	344,8 ± 21	340,8 ± 12	346,8 ± 10	349,4 ± 15	345,4 ± 12	355,6 ± 24	351,6 ± 11	348,0 ± 12	354,0 ± 14			
RDW, % CV	12,8 ± 0,5	12,1 ± 0,1	11,4 ± 0,2	12,0 ± 0,2	13,0 ± 0,1	11,3 ± 0,2	12,2 ± 0,2	11,6 ± 0,2	11,2 ± 0,1			
PCT, %	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0			
MPV, фл	4,0 ± 0,0	4,6 ± 0,1	4,4 ± 0,2	4,1 ± 0,1	5,0 ± 0,1	4,3 ± 0,2	4,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,3 ± 0,1			
PDW, %	14,7 ± 0,1	14,8 ± 0,1	14,9 ± 0,2	15,2 ± 0,4	15,0 ± 0,3	15,0 ± 0,2	15,1 ± 0,1	14,7 ± 0,1	15,0 ± 0,1			

Примечание. MCV – средний объем эритроцита, MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, RDW – ширина распределения эритроцитов, PCT – тромбокрит, MPV – средний объем тромбоцита, PDW – относительная ширина распределения тромбоцитов по объему.

Таблица 3. Основные биохимические показатели сыворотки крови крыс-самцов ложнопериорированных и после имплантации образцов пиролизического углерода для изготовления ЭКС, Me [25; 75]
 Table 3. Main biochemical parameters of the blood serum of the sham operated male rats and after implantation of pyrolytic carbon samples for the manufacture of heart valve endoprosthesis, Me [25; 75]

Показатель	Ложнопериорированные животные				ЭОУП				КОУ			
	Временной интервал после имплантации, сут											
	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Мочевина, ммоль/л	6,35 [5,67; 7,02]	6,83 [6,57; 6,89]	5,46 [5,12; 5,92]	6,88 [6,67; 7,62]	7,15 [6,88; 7,22]	5,23 [5,04; 5,68]	5,78 [5,68; 5,96]	6,45 [6,20; 6,50]	5,78 [5,44; 6,12]			
Креатинин, мкмоль/л	40,00 [38,00; 41,00]	43,00 [41,00; 43,00]	39,00 [39,00; 44,00]	35,00 [35,00; 40,00]	40,00 [40,00; 40,00]	37,00 [37,00; 38,00]	38,00 [34,00; 40,00]	39,00 [37,00; 42,00]	38,00 [35,00; 43,00]			

Окончание табл. 3

Показатель	Ложнооперированные животные				ЭОУП				КОУ							
	Временной интервал после имплантации, сут															
	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90	
АЛТ, Ед/л	62,00 [56,00; 63,00]	59,00 [58,00; 69,00]	72,00 [67,00; 81,00]	79,00 [63,00; 87,00]	60,00 [60,00; 61,00]	59,00 [52,00; 61,00]	61,00 [58,00; 62,00]	68,00 [65,00; 85,00]	67,00 [61,00; 74,00]							
АСТ, Ед/л	186,00 [179,00; 195,00]	207,00 [202,00; 243,00]	182,00 [164,00; 200,00]	224,00* [197,00; 225,00]	218,00 [218,00; 222,00]	165,00 [155,00; 175,00]	170,00 [160,00; 178,00]	189,00 [182,00; 221,00]	206,00 [194,00; 210,00]							
ЛДГ, Ед/л	2900,00 [2410,00; 3240,00]	3810,00 [3550,00; 3950,00]	4660,00 [3730,00; 4760,00]	3330,00 [3160,00; 4110,00]	3160,00 [3160,00; 3560,00]	4410,00 [3370,00; 4890,00]	2400,00 [2310,00; 3090,00]	2300,00 [2040,00; 2480,00]	2790,00 [2660,00; 3660,00]							
ЩФ, Ед/л	709,00 [465,00; 714,00]	543,00 [507,00; 553,00]	393,00 [314,00; 464,00]	422,00 [392,00; 545,00]	594,00 [506,00; 658,00]	320,00 [283,00; 348,00]	582,00 [560,00; 610,00]	503,00 [458,00; 576,00]	345,00 [316,00; 348,00]							

* Достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с группой 30-е сутки после имплантации КОУ.Таблица 4. Усредненные показатели массы органов крыс-самцов ложнооперированных и после имплантации образцов паритетического углерода для изготовления ЭКС, г ($M \pm m$)Table 4. Average indices of the masses of the organs of the sham operated male rats and after implantation of pyrolytic carbon samples for the manufacture of heart valve endoprostheses, g ($M \pm m$)

Показатель	Ложнооперированные животные				ЭОУП				КОУ							
	Временной интервал после имплантации, сут															
	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90	
Сердце	0,343 ± 0,023	0,340 ± 0,020	0,344 ± 0,009	0,342 ± 0,014	0,340 ± 0,010	0,326 ± 0,009	0,361 ± 0,015	0,341 ± 0,017	0,338 ± 0,009							
Легкие	0,515 ± 0,041	0,521 ± 0,028	0,525 ± 0,042	0,622 ± 0,018	0,618 ± 0,112	0,531 ± 0,041	0,636 ± 0,040	0,496 ± 0,027	0,587 ± 0,032							
Печень	3,919 ± 0,129	3,716 ± 0,080	3,649 ± 0,108	4,093 ± 0,127	3,878 ± 0,214	3,509 ± 0,123	4,007 ± 0,175	3,648 ± 0,095	3,349 ± 0,054*							
Селезенка	0,355 ± 0,022	0,340 ± 0,020	0,292 ± 0,017	0,414 ± 0,044	0,395 ± 0,039	0,292 ± 0,015	0,390 ± 0,030	0,408 ± 0,043	0,333 ± 0,011							
Почки	0,656 ± 0,022	0,631 ± 0,024	0,619 ± 0,040	0,703 ± 0,010	0,617 ± 0,020	0,605 ± 0,029	0,702 ± 0,008	0,640 ± 0,011	0,624 ± 0,015							
Надпочечники	0,014 ± 0,002	0,014 ± 0,002	0,013 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,014 ± 0,003	0,014 ± 0,001							
Тимус	0,114 ± 0,015	0,183 ± 0,050	0,090 ± 0,008	0,148 ± 0,019	0,114 ± 0,024	0,090 ± 0,018	0,150 ± 0,025	0,125 ± 0,007	0,127 ± 0,023							

* Достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с ложнооперированными животными.

Заклучение. В группе ложнооперированных крыс во все сроки наблюдения в подкожных тканях межлопаточной области наблюдалась гистологическая картина, характерная для нормы. Не выявлено воспалительных и некротических изменений.

На 30-е сутки в тканях, окружавших исследуемые образцы пиролитического углерода, выявлялась плотная неоформленная соединительная ткань с незначительными признаками воспаления. На 60-е сутки в области имплантации зарегистрировано формирование рубцовой ткани, состоящей из параллельно расположенных коллагеновых волокон. Признаки воспаления практически отсутствовали. На 90-е сутки в группах крыс с исследуемым и зарегистрированным образцами ткани продолжилось формирование рубцовой ткани без признаков воспаления. По данным морфометрического исследования согласно ГОСТ ISO 10993-6-2011, во все сроки наблюдения легированный бором пироуглеродный материал, синтезированный в НИИ ЯП БГУ, видимо, не оказывает раздражающего действия на ткани по сравнению с контрольным образцом.

Не выявлено существенного влияния имплантации образцов пиролитического углерода на изучаемые параметры общего и биохимического анализа крови крыс по сравнению со здоровыми животными. По результатам проведенной некропсии установлено, что в разные сроки после имплантации животным образцов материалов для изготовления эндопротезов клапанов сердца масса органов и МК животных не выходила за пределы физиологической нормы.

Таким образом, синтезированный в НИИ ЯП БГУ легированный бором пироуглеродный материал по характеристикам биосовместимости не отличается от российского аналога и может быть рекомендован для изготовления эндопротезов клапанов сердца.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Pyrolytic carbon for long-term medical implants / R. B. More [et al.] // *Biomaterials Science* / ed. B. D. Ratner. – Oxford, 2013. – P. 209–222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00023-1>
2. Bokros, J. C. Carbon biomedical devices / J. C. Bokros // *Carbon*. – 1977. – Vol. 15, N 6. – P. 353–371. [https://doi.org/10.1016/0008-6223\(77\)90324-4](https://doi.org/10.1016/0008-6223(77)90324-4)
3. Biological and functional evaluation of a novel pyrolytic carbon implant for the treatment of focal osteochondral defects in the medial femoral condyle: assessment in a canine model / S. L. Salkeld [et al.] // *J. Orthop. Surg. Res.* – 2016. – Vol. 11. – Art. 155. <https://doi.org/10.1186/s13018-016-0488-5>
4. Маянов, Е. Углеродные материалы в хирургии / Е. Маянов, П. Золкин, Х. Аберяхимов // *Медицина. Целевые проекты*. – 2015. – № 21. – С. 1–12.
5. Sadeghi, H. Dysfonctions des prothèses valvulaires cardiaques et leur traitement chirurgical [Dysfunctions of heart valve prostheses and their surgical treatment] / H. Sadeghi // *Schwiz. Med. Wochenschr.* – 1987. – Vol. 117, N 43. – P. 1665–1670.
6. Cyclic fatigue-crack propagation, stress-corrosion, and fracture-toughness behavior in pyrolytic carbon-coated graphite for prosthetic heart valve applications / R. O. Ritchie [et al.] // *J. Biomed. Mat. Res.* – 1990. – Vol. 24, N 2. – P. 189–206. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240206>
7. Beavan, L. A. Evaluation of fatigue in pyrolite carbon // *Bioceramics* / L. A. Beavan, D. W. James, J. L. Kepner; ed.: P. Ducheyne, D. Christiansen. – Oxford, 1993. – Vol. 6. – P. 205–210.
8. Beckenbaugh, R. D. Osseointegration and mechanical stability of pyrocarbon and titanium hand implants in a load-bearing *in vivo* model for small joint arthroplasty / R. D. Beckenbaugh, J. Klawitter, S. Cook // *J. Hand. Surg. Am.* – 2006. – Vol. 31, N 7. – P. 1240–1241. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2006.05.009>
9. Problematic bone fixation with pyrocarbon implants in proximal interphalangeal joint replacement: short-term results / D. B. Herren [et al.] // *J. Hand. Surg. Am.* – 2006. – Vol. 31, N 6. – P. 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.jhsb.2006.08.004>
10. Long-term follow-up of pyrocarbon metacarpophalangeal implants / S. D. Cook [et al.] // *J. Bone Joint. Surg. Am.* – 1999. – Vol. 81, N 5. – P. 635–648. <https://doi.org/10.2106/0004623-199905000-00005>
11. Результаты хирургического лечения переломов позвоночника с применением наноструктурных углеродных имплантатов (мультицентровое исследование) / С. В. Колесов [и др.] // XI Всероссийский съезд травматологов-ортопедов: материалы конф., Санкт-Петербург, 11–13 апр. 2018 г.: в 3 т. / Нац. мед. исслед. центр травматологии и ортопедии, Ассоц. травматологов-ортопедов России. – СПб., 2018. – Т. 3. – С. 473–475.
12. Экспериментальное обоснование преимуществ пары трения эндопротеза тазобедренного сустава из пироуглерода / А. Н. Митрошин [и др.] // XI Всероссийский съезд травматологов-ортопедов: материалы конф., Санкт-Петербург, 11–13 апр. 2018 г.: в 3 т. / Нац. мед. исслед. центр травматологии и ортопедии, Ассоц. травматологов-ортопедов России. – СПб., 2018. – Т. 3. – С. 161–162.
13. Легированный бором пиролитический углерод: материал для биомедицинского и инженерно-технического применения / М. И. Демиденко [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2023. – Т. 67, № 3. – С. 250–256.
14. High temperature synthesis and material properties of boron-enriched bulk pyrolytic carbon / M. Demidenko [et al.] // *Mater. Sci. Eng. B* – 2024. – Vol. 307. – P. 117491. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2024.117491>

15. Протезы клапанов сердца. Часть 1. Общие технические требования и методы испытаний: ГОСТ 31618.1-2012. – М.: Стандартинформ, 2013. – 28 с.
16. Санитарные правила и нормы 2.1.2.12–18–2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)»: утв. постановлением Гл. гос. санитар. врача Респ. Беларусь 31 окт. 2006 г., № 131.
17. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: в 2 ч. / редкол.: А. Н. Миронов (предс.) [и др.]. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
18. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes, n 123 of March 18, 1986; protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg, 1998. – 48 p.
19. Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия: руководство / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
20. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации: ГОСТ ИСО 10993-6-2011. – М.: Стандартинформ, 2013. – 23 с.
21. Краткий справочник лабораторных исследований ИООО «Синэво» / У. Г. Борейко [и др.]; под ред. В. В. Шилю, О. В. Небыльцовой. – Минск: Смэлток, 2016. – 630 с.

References

1. More R. B., Haubold A. D., Bokros J. C. Pyrolytic carbon for long-term medical implants. *Biomaterials Science*. Oxford, 2013, pp. 209–222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00023-1>
2. Bokros J. C. Carbon biomedical devices. *Carbon*, 1977, vol. 15, no. 6, pp. 353–371. [https://doi.org/10.1016/0008-6223\(77\)90324-4](https://doi.org/10.1016/0008-6223(77)90324-4)
3. Salkeld S. L., Patron L. P., Lien J. C., Cook S. D., Jones D. G. Biological and functional evaluation of a novel pyrolytic carbon implant for the treatment of focal osteochondral defects in the medial femoral condyle: assessment in a canine model. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2016, vol. 11, art. 155. <https://doi.org/10.1186/s13018-016-0488-5>
4. Mayanov E., Zolkin P., Aberyakhimov Kh. Carbon materials in surgery. *Medicina celevye proekty = Medicine targeted projects*, 2015, no. 21, pp. 1–12 (in Russian).
5. Sadeghi H. Dysfonctions des prothèses valvulaires cardiaques et leur traitement chirurgical [Dysfunctions of heart valve prostheses and their surgical treatment]. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 1987, vol. 117, no. 43, pp. 1665–1670 (in French).
6. Ritchie R. O., Dauskardt R. H., Yu W. K., Brendzel A. M. Cyclic fatigue-crack propagation, stress-corrosion, and fracture-toughness behavior in pyrolytic carbon-coated graphite for prosthetic heart valve applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1990, vol. 24, no. 2, pp. 189–206. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240206>
7. Beavan L. A., James D. W., Kepner J. L. Evaluation of fatigue in pyrolytic carbon. *Bioceramics*. Oxford, 1993, vol. 6, pp. 205–210.
8. Beckenbaugh R. D., Klawitter J., Cook S. Osseointegration and mechanical stability of pyrocarbon and titanium hand implants in a load-bearing in vivo model for small joint arthroplasty. *Journal of Hand Surgery (American volume)*, 2006, vol. 31, no. 7, pp. 1240–1241. <https://doi.org/10.1016/j.jhssa.2006.05.009>
9. Herren D. B., Schindele S., Goldhahn J., Simmen B. R. Problematic bone fixation with pyrocarbon implants in proximal interphalangeal joint replacement: short-term results. *Journal of Hand Surgery (American volume)*, 2006, vol. 31, no. 6, pp. 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.jhssb.2006.08.004>
10. Cook S. D., Beckenbaugh R. D., Redondo J., Popich L. S., Klawitter J. J., Linscheid R. L. Long-term follow-up of pyrocarbon metacarpophalangeal implants. *Journal of Bone and Joint Surgery (American volume)*, 1999, vol. 81, no. 5, pp. 635–648. <https://doi.org/10.2106/00004623-199905000-00005>
11. Kolesov S. V., Kolbovskii D. A., Rerikh V. V., Vishnevskii A. A., Basankin I. V., Skorina I. V., Kaz'min A. I., Pereverzev V. S., Panteleev A. A. Results of surgical treatment of vertebral fractures using nanostructured carbon implants (multi-center study). *XI Vserossiiskii s'ezd travmatologov-ortopedov: materialy konferentsii, Sankt-Peterburg, 11–13 aprelya 2018 goda. Tom 3* [XI All-Russian Congress of Traumatologists and Orthopedists: Conference Proceedings, St. Petersburg, April 11–13, 2018. Vol. 3]. Saint Petersburg, 2018, pp. 473–475 (in Russian).
12. Mitroshin A. N., Kibitkin A. S., Ksenofontov D. A., Kosmynin D. A. Experimental substantiation of the advantages of a friction pair of a pyrocarbon endoprosthesis of the hip joint. *XI Vserossiiskii s'ezd travmatologov-ortopedov: materialy konferentsii, Sankt-Peterburg, 11–13 aprelya 2018 goda. Tom 3* [XI All-Russian Congress of Traumatologists and Orthopedists: Conference Proceedings, St. Petersburg, April 11–13, 2018. Vol. 3]. Saint Petersburg, 2018, pp. 161–162 (in Russian).
13. Demidenko M. I., Adamchuk D. V., Rusanov A. P., Sirotkin S. V., Ivan'ko L. V., Maksimenko S. A. Boron-enriched pyrolytic carbon: material for biomedical and engineering-technical applications. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2023, vol. 67, no. 3, pp. 250–256 (in Russian).
14. Demidenko M., Adamchuk D., Liubimau A., Uglov V., Ishchenko A., Chekan M., Khama M., Maksimenko S. High temperature synthesis and material properties of boron-enriched bulk pyrolytic carbon. *Materials Science and Engineering B*, 2024, vol. 307, p. 117491. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2024.117491>
15. State Standard 31618.1-2012. Prosthetic heart valves. Part 1: General specifications and test methods. Moscow, Standardinform Publ., 2013. 28 p. (in Russian).
16. Sanitary rules and norms 2.1.2.12–18–2006 “Device, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums)”: approved by the Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus, No. 131, October 31, 2006 (in Russian).

17. Mironov A. N. (ed.). *A guide to preclinical drug research*. Moscow, Grif i K Publ., 2012. 944 p. (in Russian).
18. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes, n 123 of March 18, 1986; protocol of amendment to the european convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. Strasbourg, June 22, 1998. 48 p.
19. Avtandilov G. G. *Medical morphometry*. Moscow, Meditsina Publ., 1990. 384 p. (in Russian).
20. State Standard 10993-6-2011. Medical products. *Evaluation of the biological effect of medical devices. Part 6. Local action studies after implantation*. Moscow, Standartinform Publ., 2013. 23 p. (in Russian).
21. Glazkova S. E., Kugaev O. L., Luk'yanenok D. M., Novikova I. N., Parkhamovich V. N., Turkovskii G. S. [et al.]. *Concise reference book of laboratory researches of IOOO "Sinevo"*. Minsk, Smeltok Publ., 2016. 630 p. (in Russian).

Информация об авторах

Демиденко Марина Ивановна – заведующий лабораторией. Институт ядерных проблем БГУ (ул. Бобруйская, 11, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: midemidenko67@gmail.com

Жаворонок Ирина Петровна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-9982-0719>. E-mail: iri8308@yandex.ru

Адамчук Дмитрий Вячеславович – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник. Институт ядерных проблем БГУ (ул. Бобруйская, 11, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-2845-4744>. E-mail: adamchuk.dzmitry@yahoo.com

Кулагова Татьяна Александровна – канд. биол. наук, доцент, заведующий сектором. Институт ядерных проблем БГУ (ул. Бобруйская, 11, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-1113-7323>. E-mail: tatyana.kulagova@gmail.com

Антипова Ольга Александровна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-5418-0874>. E-mail: mayuha@yandex.ru

Басалай Анастасия Александровна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-1878-9623>. E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com

Кузнецова Татьяна Евгеньевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tania_k@mail.ru

Максименко Сергей Афанасьевич – д-р физ.-мат. наук, профессор, директор. Институт ядерных проблем БГУ (ул. Бобруйская, 11, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-8271-0449>. E-mail: sergey.maksimenko@gmail.com

Information about the authors

Marina I. Demidenko – Head of the Laboratory. Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University (11, Bobruiskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: midemidenko67@gmail.com

Irina P. Zhavoronok – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-9982-0719>. E-mail: iri8308@yandex.ru

Dmitry V. Adamchuk – Ph. D. (Physics and Mathematics), Senior Researcher. Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University (11, Bobruiskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-2845-4744>. E-mail: adamchuk.dzmitry@yahoo.com

Tatsiana A. Kulahava – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Sector. Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University (11, Bobruiskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-1113-7323>. E-mail: tatyana.kulagova@gmail.com

Olga A. Antipova – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-5418-0874>. E-mail: mayuha@yandex.ru

Anastasia A. Basalai – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-1878-9623>. E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com

Tatyana E. Kuznetsova – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tania_k@mail.ru

Sergey A. Maksimenko – D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, Director. Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University (11, Bobruiskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-8271-0449>. E-mail: sergey.maksimenko@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.36-008.9-002-092.4:612.441.018.2:612.123:175.44

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-282-293>

Поступила в редакцию 10.07.2024

Received 10.07.2024

Е. Н. Чепелева, Ф. И. Висмонт*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь***ЗНАЧИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССАХ
ДЕТОКСИКАЦИИ, ФОРМИРОВАНИИ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА
И ДИСЛИПИДЕМИИ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ**

Аннотация. Перитонит является хирургической и общепатологической проблемой, актуальность которой не снижается, несмотря на достижения современной клинической и экспериментальной медицины. Перитонит, будучи одним из тяжелейших осложнений различных заболеваний и повреждений органов брюшной полости, запускает сложный каскад патологических реакций с нарушением процессов жизнедеятельности. Летальность при перитоните составляет 20–30 %, а при наиболее тяжелых его формах – 50–80 %. Высокая летальность обусловлена эндотоксикемией, полиорганной недостаточностью и сепсисом. К настоящему времени накопилось достаточно данных, свидетельствующих о значимости аргиназы печени в процессах детоксикации и жизнедеятельности организма в норме и при патологии. Были основания полагать, что ее активность будет иметь значимость в патогенезе перитонита. Однако значимость активности аргиназы печени в процессах детоксикации и в патогенезе септических состояний, перитонита в частности, до сих пор изучена недостаточно.

Целью исследования являлось выяснение значимости активности аргиназы печени в процессах детоксикации, формировании тиреоидного статуса и дислипидемии у крыс с экспериментальным перитонитом (CLP-модель).

В опытах на крысах установлено, что в изменении содержания общего холестерина в печени и липопротеинах в сыворотке крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови и температуры тела при CLP-перитоните участвуют аргиназа печени и монооксид азота. Развитие CLP-перитонита в условиях депрессии аргиназы печени N^ω-гидрокси-нор-L-аргинином в дозе 10 мг/кг сопровождается более выраженным угнетением детоксикационной функции печени, усугублением изменения содержания общего холестерина в печени и липопротеинах сыворотки крови, уровня йодсодержащих гормонов в плазме крови и способствует развитию вторичной дислипидемии.

Ключевые слова: экспериментальный перитонит, аргиназа печени, холестерин липопротеинов, тиреоидный статус, детоксикация, печень, монооксид азота, крысы

Для цитирования: Чепелева, Е. Н. Значимость активности аргиназы печени в процессах детоксикации, формировании тиреоидного статуса и дислипидемии у крыс с экспериментальным перитонитом / Е. Н. Чепелева, Ф. И. Висмонт // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2024. – Т. 21, № 4. – С. 282–293. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-282-293>

Elena N. Chepeleva, Frantishek I. Vismont*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus***SIGNIFICANCE OF THE LIVER ARGINASE ACTIVITY IN THE PROCESSES
OF DETOXIFICATION, FORMATION OF THYROID STATUS AND DYSLIPIDEMIA
IN RATS WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS**

Abstract. Peritonitis is a surgical and general pathological problem, the relevance of which does not decrease despite the achievements of modern clinical and experimental medicine. Peritonitis, being one of the most severe complications of various diseases and injuries to the abdominal organs, triggers a complex cascade of pathogenetic reactions with disruption of vital processes. The mortality rate for peritonitis is 20–30 %, and in its most severe forms it reaches 50–80 %. High mortality is caused by endotoxemia, multiple organ failure and sepsis. To date, sufficient data have been accumulated, indicating the importance of liver arginase in the processes of detoxification and vital activity of the body in normal conditions and in pathology. There were reasons to believe that its activity would be significant in the pathogenesis of peritonitis. However, the elucidation of significance of the liver arginase activity in detoxification processes and in the pathogenesis of septic conditions and peritonitis in particular has been still little studied.

The purpose of the study was to determine the significance of the liver arginase activity in the processes of detoxification, the formation of thyroid status and dyslipidemia in rats with experimental peritonitis (CLP-model).

In experiments on rats, it was found that liver arginase and nitrogen monoxide are involved in changes in the content of total cholesterol in the liver and lipoproteins in the blood serum, the level of iodine-containing thyroid hormones in the

blood plasma and body temperature during CLP-peritonitis. Developing CLP-peritonitis in the conditions of liver arginase depression by N^o-hydroxy-nor-L-arginine at a dose of 10 mg/kg is accompanied by a more pronounced inhibition of the detoxification function of the liver, worsening changes in the content of total cholesterol in the liver and lipoproteins in the blood serum, and the level of iodine-containing hormones in the blood plasma and contributes to the development of secondary dislipoproteinemia.

Keywords: experimental peritonitis, liver arginase, lipoprotein cholesterol, thyroid status, detoxification, liver, nitrogen monoxide, rats

For citation: Chepeleva E. N., Vismont F. I. Significance of the liver arginase activity in the processes of detoxification, formation of thyroid status and dyslipidemia in rats with experimental peritonitis. *Vestsi Natsyuanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 4, pp. 282–293 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-282-293>

Введение. Несмотря на заметный прогресс в хирургическом лечении острых хирургических заболеваний органов брюшной полости, частота их осложнений и, в частности, развития перитонита остается высокой и составляет 20–30 %, достигая при наиболее тяжелых формах 50–80 % [1]. Патогенез распространенного перитонита – сложный, динамичный процесс, главенствующая роль в развитии которого отводится эндотоксинемии, обусловленной как накоплением в организме токсичных продуктов в результате нарушения обмена веществ, так и поступлением из брюшной полости токсинов [2]. В связи с этим поиск путей коррекции основных жизненных функций и обмена веществ при септических состояниях, в частности при перитоните, является одной из актуальных задач современной медицины.

В настоящее время накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значимости аргиназы печени в процессах детоксикации и жизнедеятельности организма в норме и при патологии [3, 4]. Показано, что от функционального состояния печени зависят уровень липидов в крови, метаболизм йодсодержащих гормонов щитовидной железы, имеющих важное значение в процессах их регуляции и детоксикации [5–7]. В ряде исследований выявлено, что изменение уровня тиреоидных гормонов в крови тесно коррелирует с продукцией в организме монооксида азота (NO), в образовании которого имеет значение и аргиназа печени [8, 9]. Учитывая, что активность аргиназы печени лимитирует доступность L-аргинина для индуцибельной NO-синтазы, были основания полагать, что ее активность будет сказываться на процессе образования NO, который играет важную роль в механизмах регуляции детоксикационной функции печени, метаболических процессах, формировании тиреоидного статуса и терморегуляции.

Подтверждение было получено в опытах на крысах при выяснении особенностей изменения содержания холестерина (ХС) различных классов липопротеинов (ЛП) в сыворотке крови, активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови, уровней NOx и тиреоидных гормонов в плазме крови и температуры тела в условиях депрессии аргиназы печени.

Цель работы – выяснение значимости участия аргиназы печени в процессах детоксикации, формировании тиреоидного статуса и дислипидемии у крыс с экспериментальным перитонитом.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 198 взрослых белых крысах-самцах массой 180–220 г. Эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными, а также руководствуясь требованиями директив Европарламента и Совета Европейского союза (2010/63/EU), регулирующих использование животных в научных целях [10].

До постановки эксперимента животных адаптировали к условиям вивария. Они получали полноценный пищевой рацион в соответствии с правилами содержания лабораторных животных [11]. Питьевой режим соответствовал принципу *ad libitum*. В связи с имеющимися в литературе данными о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания содержания ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, опыты проводили в строго определенное время (8–12 ч утра), соблюдая термонейтральные условия (20–22 °С).

Для создания экспериментального перитонита использована модель лигирования и последующего однократного пунктирования слепой кишки – CLP (cecal ligation and puncture) [12, 13].

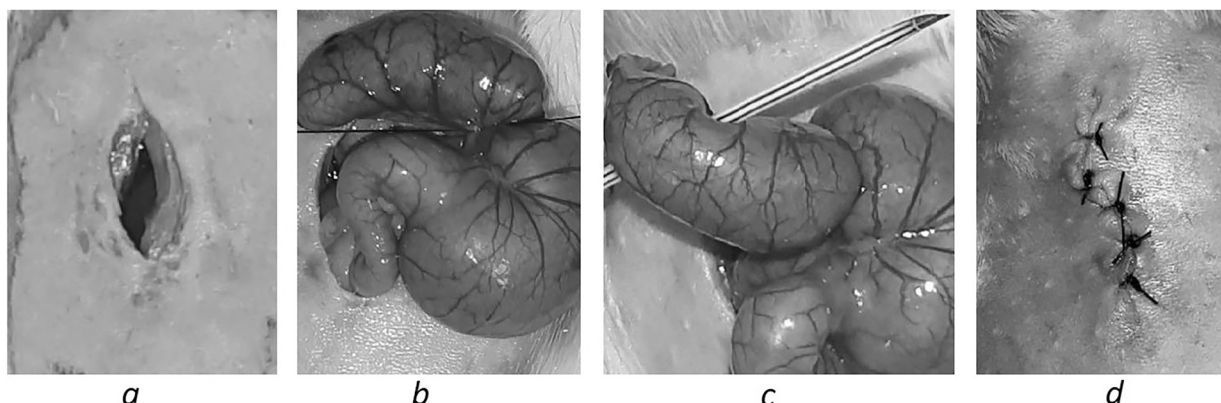
Для этого крысам под гексеналовым наркозом (100 мг/кг, внутривенно) делали двухсантиметровый разрез передней брюшной стенки, через который извлекали слепую кишку. Затем ниже илеоцекального клапана на кишку накладывали лигатуру и однократно пунктировали ее иглой с внешним диаметром 1,3 мм (18 gauge). Пассажи пищевых масс при этом не нарушался. По данным литературы, через 18–24 ч после CLP-операции у животных развивается тяжелый полимикробный сепсис, который сопровождается выраженной полиорганной недостаточностью. В качестве контроля использовали ложноперитонизированных (ЛО) крыс, которым под наркозом проводили разрез передней брюшной стенки без извлечения и пунктирования слепой кишки. Всем животным ушивали брюшную стенку и через 30 мин после оперативного вмешательства подкожно вводили 2,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Схематическое изображение CLP-операции у крыс представлено на рисунке.

Декапитацию животных проводили через 24 ч после лигирования и пунктирования слепой кишки или ложной операции. Забор крови, ткани печени у контрольных и опытных животных осуществляли за максимально короткое время после декапитации. Суммарную фракцию ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) и ЛП низкой плотности (ЛПНП) из сыворотки крови выделяли путем осаждения по методу M. Burstein и J. Samaille [14]. Для определения содержания общего ХС, ХС ЛП высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке крови и ХС в тканевых гомогенатах проводили экстракцию липидов по методу M. A. Креховой, M. K. Чехрановой [15]. Содержание ХС в сухих липидных экстрактах сыворотки крови оценивали с помощью реакции Либермана–Бурхарда, а содержание ХС суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП – по формуле $\text{ХС ЛПОНП} + \text{ЛПНП} = \text{общий ХС сыворотки крови} - \text{ХС ЛПВП}$.

Коэффициент атерогенности (КА) рассчитывали по следующей формуле: $(\text{ХС ЛПОНП} + \text{ЛПНП})/\text{ХС ЛПВП}$.

С целью выяснения значимости активности аргиназы печени в развитии выявленных изменений исследуемых показателей при CLP-перитоните использовали ингибитор аргиназы печени N^ω-гидрокси-нор-L-аргинин (nor-NOHA). Nor-NOHA в дозе 10 мг/кг вводили крысам внутривенно однократно ежедневно в течение недели. В указанной дозе данный ингибитор широко используется в экспериментальной практике с целью выяснения значимости аргиназы печени в процессах жизнедеятельности [16].

Производство NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NOx) [17]. Содержание общего и свободного трийодтиронина (T₃) и тироксина (T₄) в плазме крови определяли радиоиммунологическим методом, используя наборы реактивов РИА-T₃-СТ, РИА-свT₃-СТ, РИА-T₄-СТ и РИА-свT₄ производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».



Схематическое изображение CLP-операции у крыс: *a* – продольный разрез передней брюшной стенки; *b* – извлечение слепой кишки и наложение лигатуры ниже илеоцекального клапана; *c* – однократное пунктирование слепой кишки иглой; *d* – возвращение слепой кишки в брюшную полость и ушивание брюшной стенки

Schematic representation of CLP-surgery in rats: *a* – a longitudinal incision was made in the anterior abdominal wall; *b* – the cecum was removed and a ligature was applied below the ileocecal valve; *c* – a single puncture of the cecum with a needle was performed; *d* – the cecum was returned to the abdominal cavity and the abdominal wall was sutured

Тяжесть поражения печени оценивали по изменению соотношения активности АлАТ и АсАТ (АлАТ/АсАТ) в сыворотке крови. Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови определяли колориметрическим динитрофенилгидрозиновым методом [18].

О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), концентрации в плазме крови фракции «средних молекул» (СМ) и степени токсичности крови (СТК). Содержание СМ определяли методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В. М. Моиным с соавт. [19], СТК – способом, предложенным О. А. Радьковой с соавт. [20]. О ПНС у крыс (гексенал 100,0 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) судили по времени нахождения животных в боковом положении.

Животные были разделены на следующие экспериментальные группы:

Интактные ($n = 18$) – интактные крысы;

ЛО ($n = 18$) – ложнооперированные крысы, которым под наркозом проводили разрез передней брюшной стенки без извлечения и пунктирования слепой кишки;

CLP-перитонит ($n = 27$) – крысы, которым выполняли CLP-операцию;

Контроль + ФР ($n = 18$) – крысы, которым внутривнутрибрюшинно вводили 1,0 мл физраствора ежедневно в течение недели;

Контроль + *por*-НОНА ($n = 18$) – крысы, которым внутривнутрибрюшинно вводили *por*-НОНА в дозе 10 мг/кг ежедневно в течение недели;

ЛО + ФР ($n = 18$) – крысы, которым внутривнутрибрюшинно вводили 1,0 мл физраствора ежедневно в течение недели и после этого выполняли ложную операцию;

ЛО + *por*-НОНА ($n = 18$) – крысы, которым внутривнутрибрюшинно вводили *por*-НОНА в дозе 10 мг/кг ежедневно в течение недели и после этого выполняли ложную операцию;

CLP-перитонит + ФР ($n = 28$) – крысы, которым внутривнутрибрюшинно вводили 1,0 мл физраствора ежедневно в течение недели и после этого выполняли CLP-операцию;

CLP-перитонит + *por*-НОНА ($n = 35$) – крысы, которым внутривнутрибрюшинно вводили 1,0 мл физраствора ежедневно в течение недели и после этого выполняли CLP-операцию.

В группах CLP-перитонит, CLP-перитонит + ФР и CLP-перитонит + *por*-НОНА через 24 ч после моделирования CLP-перитонита выживаемость животных составила 66,7; 64,3 и 51,4 % соответственно.

У всех животных с помощью электротермометра ТПЭМ-1 (НПО «Медфизприбор», Российская Федерация) измеряли ректальную температуру.

Достоверность различий между группами показателей оценивали по *t*-критерию Стьюдента для независимых выборок. Все данные представляли в виде среднего арифметического и ошибки среднего арифметического ($X \pm S_x$). Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Показано, что через 24 ч после CLP-операции у всех крыс развиваются некротические изменения в слепой кишке, отмечаются перитонит с выпотом в брюшную полость и парез кишечника, имеются выраженные признаки генерализованной воспалительной реакции: адинамия, вялость, в большинстве случаев – геморрагический конъюнктивит и диарея.

Установлено, что в условиях экспериментального перитонита через 24 ч после CLP-операции ректальная температура снижалась на 1,1 °C ($p < 0,001$): с $37,9 \pm 0,14$ °C у ЛО крыс ($n = 10$) до $36,8 \pm 0,21$ °C у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$). У крыс в условиях депрессии аргиназы печени ($n = 10$) с помощью *por*-НОНА через 24 ч после CLP-операции (CLP-перитонит + *por*-НОНА) температура тела была на 0,6 °C ниже ($p < 0,05$), чем у животных с CLP-перитонитом ($n = 10$), которым вводили 1,0 мл физраствора (CLP-перитонит + ФР), – $36,0 \pm 0,16$ °C.

Выявлено, что содержание общего ХС в печени крыс после CLP-операции повышалось на 37,2 % ($p < 0,01$): у ЛО животных ($n = 10$) оно составляло $0,235 \pm 0,016$ мг/100 мг ткани, а у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$) – $0,321 \pm 0,018$ мг/100 мг ткани. Кроме того, имело место повышение содержания общего ХС в сыворотке крови на 23,7 % ($p < 0,05$) – с $2,66 \pm 0,14$ ммоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $3,29 \pm 0,17$ ммоль/л у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$), а также отмечались выраженные изменения в содержании ХС различных классов ЛП в сыворотке крови крыс: содержание ХС ЛПВП снижалось на 42,4 % ($p < 0,01$) – с $1,32 \pm 0,18$ ммоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $0,76 \pm 0,08$ ммоль/л

у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$), содержание ХС ЛПОНП + ЛПНП повышалось на 88,8 % ($p < 0,001$) – с $1,34 \pm 0,07$ ммоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $2,53 \pm 0,13$ ммоль/л у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$). Установлено, что в условиях CLP-перитонита имело место возрастание Ка на 185,8 % ($p < 0,001$): с $1,27 \pm 0,23$ ед. у ЛО крыс ($n = 10$) до $3,63 \pm 0,40$ ед. у животных с CLP-перитонитом ($n = 10$). Выявлено, что у крыс с CLP-перитонитом в условиях системного действия в организме *por*-НОНА отмечаются более выраженные изменения содержания общего ХС в печени и сыворотке крови, а также ХС различных классов ЛП в сыворотке крови. Так, содержание общего ХС в печени крыс в группе CLP-перитонит + *por*-НОНА ($n = 10$) в сравнении с группой CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) повышалось на 19,9 % ($p < 0,05$): с $0,327 \pm 0,021$ до $0,392 \pm 0,020$ мг/100 мг ткани. В данных условиях имело место и повышение на 19,3 % содержания общего ХС в сыворотке крови ($p < 0,01$): с $3,47 \pm 0,17$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) до $4,14 \pm 0,14$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + *por*-НОНА ($n = 10$). У животных с CLP-перитонитом в условиях депрессии аргиназы печени с помощью *por*-НОНА обнаружены выраженные изменения содержания ХС в различных классах ЛП сыворотки крови, в частности повышение содержания ХС ЛПОНП + ЛПНП на 17,0 % ($p < 0,05$): с $2,65 \pm 0,17$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) до $3,10 \pm 0,14$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + *por*-НОНА ($n = 10$), а также повышение на 26,8 % содержания ХС ЛПВП в сыворотке крови ($p < 0,01$): с $0,82 \pm 0,05$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) до $1,04 \pm 0,02$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + *por*-НОНА ($n = 10$). Уровень Ка в группе CLP-перитонит + *por*-НОНА ($n = 10$) в сравнении с группой CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) статистически значимо не изменялся ($p > 0,05$) и составлял $3,00 \pm 0,16$ ед. Данные о содержании общего ХС в печени и сыворотке крови, а также ХС различных классов ЛП в сыворотке крови и Ка у крыс с экспериментальным перитонитом (CLP-модель) в условиях действия в организме животных ингибитора аргиназы печени *por*-НОНА представлены в табл. 1.

Развитие перитонита у крыс ($n = 10$) сопровождалось повышением активности АлАТ в сыворотке крови на 183,9 % по сравнению с данным показателем у ЛО животных ($n = 10$) ($p < 0,001$), составляя $0,62 \pm 0,04$ мккат/л у ЛО крыс и $1,76 \pm 0,11$ мккат/л у опытных животных после CLP-операции. Активность АсАТ в плазме крови крыс в этих условиях была на 33,8 % выше, чем у ЛО животных ($p < 0,05$), и составляла $0,65 \pm 0,05$ мккат/л у ЛО крыс ($n = 10$) и $0,87 \pm 0,08$ мккат/л у опытных животных ($n = 10$). Соотношение активности АсАТ/АлАТ у животных после CLP-операции понизилось на 53,6 % ($p < 0,01$) и составило $1,10 \pm 0,12$ у ЛО крыс ($n = 10$) и $0,51 \pm 0,06$ у животных с CLP-перитонитом ($n = 10$).

Установлено, что внутрибрюшинное введение крысам ингибитора аргиназы печени *por*-НОНА в группе Контроль + *por*-НОНА ($n = 10$) приводит к повышению активности АсАТ на 25,0 % ($p < 0,05$), АлАТ – на 25,8 % ($p > 0,05$) в сыворотке крови в сравнении с аналогичными показателями в группе Контроль + ФР ($n = 10$). При этом соотношение активности АсАТ/АлАТ статистически значимо не изменялось ($p > 0,05$).

Активность АсАТ и АлАТ в сыворотке крови крыс при развитии CLP-перитонита в условиях депрессии аргиназы печени *por*-НОНА в группе CLP-перитонит + *por*-НОНА ($n = 10$) в сравнении с животными с CLP-перитонитом, которым вводили физраствор, в группе CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) понижалась на 26,1 % ($p < 0,05$) и 25,1 % ($p < 0,05$) соответственно. При этом соотношение активности АсАТ/АлАТ в данных условиях статистически значимо не изменялось ($p > 0,05$).

Обнаружено, что при перитоните в организме крыс через 24 ч после CLP-операции имело место снижение в плазме крови содержания T_4 на 31,4 % ($p < 0,01$): с $49,32 \pm 3,08$ нмоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $33,85 \pm 2,26$ нмоль/л у опытных животных ($n = 10$). Кроме того, отмечалось снижение в плазме крови уровня T_3 на 30,5 % ($p < 0,05$): с $1,67 \pm 0,14$ нмоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $1,16 \pm 0,14$ нмоль/л у опытных животных ($n = 10$). При этом в данных условиях уровни $свT_4$ и $свT_3$ снижались на 33,2 % ($p < 0,001$) и 34,0 % ($p < 0,05$) соответственно. Содержание $свT_4$ снижалось с $13,95 \pm 0,57$ пмоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $9,32 \pm 0,34$ пмоль/л у опытных животных ($n = 10$), а $свT_3$ снижалось с $3,76 \pm 0,34$ пмоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $2,48 \pm 0,26$ пмоль/л у опытных животных ($n = 10$).

Таблица 1. Изменение содержания общего ХС в печени и сыворотке крови, а также ХС в различных классах ЛП сыворотки крови и Ка у крыс с экспериментальным перитонитом в условиях депрессии аргиназы печени *nor*-NOHA (10 мг/кг)Table 1. Changes in the content of total cholesterol in the liver and blood serum, as well as cholesterol in various classes of serum drugs and Ka in rats with experimental peritonitis under the conditions of liver arginase depression using *nor* NOHA (10 mg/kg)

Группа животных	Общий ХС печени, мг/100 мг ткани	Общий ХС крови, ммоль/л	ХС ЛПВП, ммоль/л	ХС ЛПОНП + ЛПНП, ммоль/л	Ка, ед.
1. Интактные ($n = 10$)	$0,231 \pm 0,013$	$2,73 \pm 0,15$	$1,37 \pm 0,17$	$1,36 \pm 0,06$	$1,18 \pm 0,20$
2. ЛО ($n = 10$)	$0,235 \pm 0,016$ $p_{2-1} > 0,05$	$2,66 \pm 0,14$ $p_{2-1} > 0,05$	$1,32 \pm 0,18$ $p_{2-1} > 0,05$	$1,34 \pm 0,07$ $p_{2-1} > 0,05$	$1,27 \pm 0,23$ $p_{2-1} > 0,05$
3. CLP-перитонит ($n = 10$)	$0,321 \pm 0,018$ $p_{3-1} < 0,01$ $p_{3-2} < 0,01$	$3,29 \pm 0,17$ $p_{3-1} < 0,05$ $p_{3-2} < 0,05$	$0,76 \pm 0,08$ $p_{3-1} < 0,05$ $p_{3-2} < 0,01$	$2,53 \pm 0,13$ $p_{3-1} < 0,001$ $p_{3-2} < 0,001$	$3,63 \pm 0,40$ $p_{3-1} < 0,001$ $p_{3-2} < 0,001$
4. Контроль + ФР ($n = 10$)	$0,238 \pm 0,014$ $p_{4-1} > 0,05$	$2,72 \pm 0,14$ $p_{4-1} > 0,05$	$1,32 \pm 0,13$ $p_{4-1} > 0,05$	$1,41 \pm 0,06$ $p_{4-1} > 0,05$	$1,18 \pm 0,14$ $p_{4-1} > 0,05$
5. Контроль + <i>nor</i> -NOHA ($n = 10$)	$0,280 \pm 0,012$ $p_{5-1} < 0,05$ $p_{5-4} < 0,05$	$3,21 \pm 0,13$ $p_{5-1} < 0,05$ $p_{5-4} < 0,05$	$1,31 \pm 0,08$ $p_{5-1} > 0,05$ $p_{5-4} > 0,05$	$1,90 \pm 0,10$ $p_{5-1} < 0,001$ $p_{5-4} < 0,001$	$1,50 \pm 0,12$ $p_{5-1} > 0,05$ $p_{5-4} > 0,05$
6. ЛО + ФР ($n = 10$)	$0,235 \pm 0,012$ $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$	$2,70 \pm 0,12$ $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$	$1,33 \pm 0,14$ $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$	$1,37 \pm 0,08$ $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$	$1,22 \pm 0,22$ $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$
7. ЛО + <i>nor</i> -NOHA ($n = 10$)	$0,284 \pm 0,013$ $p_{7-2} < 0,05$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} < 0,05$	$3,23 \pm 0,14$ $p_{7-2} < 0,05$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} < 0,05$	$1,31 \pm 0,10$ $p_{7-2} > 0,05$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} > 0,05$	$1,92 \pm 0,10$ $p_{7-2} < 0,001$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} < 0,001$	$1,55 \pm 0,15$ $p_{7-2} > 0,05$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} > 0,05$
8. CLP-перитонит + ФР ($n = 10$)	$0,327 \pm 0,021$ $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,01$	$3,47 \pm 0,17$ $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,01$	$0,82 \pm 0,05$ $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,01$	$2,65 \pm 0,17$ $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,001$	$3,43 \pm 0,39$ $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,001$
9. CLP-перитонит + <i>nor</i> -NOHA ($n = 10$)	$0,392 \pm 0,020$ $p_{9-3} < 0,05$ $p_{9-6} < 0,001$ $p_{9-7} < 0,01$ $p_{9-8} < 0,05$	$4,14 \pm 0,14$ $p_{9-3} < 0,01$ $p_{9-6} < 0,001$ $p_{9-7} < 0,001$ $p_{9-8} < 0,01$	$1,04 \pm 0,02$ $p_{9-3} < 0,01$ $p_{9-6} > 0,05$ $p_{9-7} > 0,05$ $p_{9-8} < 0,01$	$3,10 \pm 0,14$ $p_{9-3} < 0,05$ $p_{9-6} < 0,001$ $p_{9-7} < 0,001$ $p_{9-8} < 0,05$	$3,00 \pm 0,16$ $p_{9-3} > 0,05$ $p_{9-6} < 0,001$ $p_{9-7} < 0,001$ $p_{9-8} > 0,05$

Выявлено, что CLP-перитонит в условиях депрессии аргиназы печени с помощью *nor*-NOHA сопровождался выраженными изменениями уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы у крыс. Так, у крыс в группе CLP-перитонит + *nor*-NOHA ($n = 10$) в сравнении с группой CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) содержание T_4 в плазме крови снижалось на 42,9 % ($p < 0,001$): с $33,07 \pm 2,26$ до $18,87 \pm 1,54$ нмоль/л, а содержание T_3 понижалось на 29,3 % ($p < 0,05$): с $1,16 \pm 0,12$ до $0,82 \pm 0,05$ нмоль/л. В этих условиях содержание св T_4 в плазме крови понижалось на 43,9 % ($p < 0,001$): с $9,28 \pm 0,39$ пмоль/л в группе CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) до $5,21 \pm 0,22$ пмоль/л в группе CLP-перитонит + *nor*-NOHA ($n = 10$), а уровень св T_3 в плазме крови понижался на 27,9 % ($p < 0,05$): с $2,44 \pm 0,21$ пмоль/л в группе CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) до $1,76 \pm 0,15$ пмоль/л в группе CLP-перитонит + *nor*-NOHA ($n = 10$).

В группе Интактные животные ($n = 10$) продукция NOx в плазме крови и активность аргиназы печени составляли $12,87 \pm 1,32$ мкмоль/л и $5,64 \pm 0,37$ мкмоль мочевины/г сырой ткани · ч соответственно, а в группе ЛО ($n = 10$) – $12,58 \pm 1,27$ мкмоль/л и $5,81 \pm 0,41$ мкмоль мочевины/г сырой ткани · ч соответственно. Развитие CLP-перитонита у крыс ($n = 10$) приводило, в сравнении с группой ЛО животных ($n = 10$), к повышению продукции NOx в плазме крови на 72,3 % ($p < 0,01$) и снижению активности аргиназы печени на 36,3 % ($p < 0,01$) – до $21,67 \pm 1,86$ мкмоль/л и $3,70 \pm 0,21$ мкмоль мочевины/г сырой ткани · ч соответственно.

В условиях депрессии аргиназы печени *nor*-NOHA развитие CLP-перитонита сопровождалось более значимым снижением активности аргиназы и более выраженным повышением уровня NOx в плазме крови. В группе животных CLP-перитонит + *nor*-NOHA ($n = 10$) в сравнении с груп-

пой CLP-перитонит + ФР ($n = 10$) уровень NOx в плазме крови повышался на 56,1 % ($p < 0,01$) и составлял $33,38 \pm 1,93$ мкмоль/л, а активность аргиназы печени у крыс в данных условиях понижалась на 77,2 % ($p < 0,001$) и составляла $0,86 \pm 0,04$ мкмоль мочевины/г сырой ткани · ч. Изменение активности аргиназы печени и продукции NOx в плазме крови у крыс после CLP-перитонита в условиях депрессии аргиназы печени nor-NOHA представлено в табл. 2.

Таблица 2. Изменение активности аргиназы печени и уровня NOx в плазме крови крыс с CLP-перитонитом в условиях депрессии аргиназы печени nor-NOHA (10 мг/кг)

Table 2. Changes in the liver arginase activity and NOx levels in blood plasma in rats with CLP-peritonitis under the conditions of liver arginase depression using nor-NOHA (10 mg/kg)

Группа животных	Активность аргиназы печени, мкмоль мочевины/г сырой ткани · ч	NOx, мкмоль/л
1. Интактные ($n = 10$)	$5,64 \pm 0,37$	$12,87 \pm 1,32$
2. ЛО ($n = 10$)	$5,81 \pm 0,41$ $p_{2-1} > 0,05$	$12,58 \pm 1,27$ $p_{2-1} > 0,05$
3. CLP-перитонит ($n = 10$)	$3,70 \pm 0,21$ $p_{3-1} < 0,01$ $p_{3-2} < 0,01$	$21,67 \pm 1,86$ $p_{3-1} < 0,01$ $p_{3-2} < 0,01$
4. Контроль + ФР ($n = 10$)	$5,68 \pm 0,33$ $p_{4-1} > 0,05$	$13,13 \pm 1,25$ $p_{4-1} > 0,05$
5. Контроль + nor-NOHA ($n = 10$)	$1,08 \pm 0,06$ $p_{5-1} < 0,001$ $p_{5-4} < 0,001$	$25,09 \pm 2,74$ $p_{5-1} < 0,01$ $p_{5-4} < 0,01$
6. ЛО + ФР ($n = 10$)	$5,56 \pm 0,35$ $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$	$13,23 \pm 1,19$ $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$
7. ЛО + nor-NOHA ($n = 10$)	$1,02 \pm 0,04$ $p_{7-2} < 0,001$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} < 0,001$	$25,62 \pm 2,58$ $p_{7-2} < 0,01$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} < 0,01$
8. CLP-перитонит + ФР ($n = 10$)	$3,78 \pm 0,19$ $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,01$	$21,38 \pm 1,87$ $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,01$
9. CLP-перитонит + nor-NOHA ($n = 10$)	$0,86 \pm 0,04$ $p_{9-3} < 0,001$ $p_{9-6} < 0,001$ $p_{9-7} < 0,05$ $p_{9-8} < 0,001$	$33,38 \pm 1,93$ $p_{9-3} < 0,01$ $p_{9-6} < 0,001$ $p_{9-7} < 0,05$ $p_{9-8} < 0,01$

Согласно полученным данным, через 24 ч после CLP-операции имело место угнетение детоксикационной функции печени, что проявлялось повышением СТК на 125,2 % ($p < 0,001$; $n = 10$), уровня СМ в плазме крови на 70,0 % ($p < 0,001$; $n = 10$) и увеличением ПНС на 43,4 % ($p < 0,05$; $n = 8$) по сравнению с ЛО животными.

В условиях депрессии аргиназы печени nor-NOHA (в группе CLP-перитонит + nor-NOHA) развитие CLP-перитонита у крыс сопровождалось более выраженным угнетением детоксикационной функции печени. Через 24 ч после CLP-операции в данных условиях были получены следующие значения показателей детоксикационной функции печени: повышение СТК на 26,0 % ($p < 0,05$; $n = 10$), уровня СМ в плазме крови – на 17,7 % ($p < 0,001$; $n = 10$), ПНС – на 28,3 % ($p < 0,05$; $n = 8$) в сравнении с группой CLP-перитонит + ФР. Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС в группе CLP-перитонит + ФР составили $1,288 \pm 0,027$ г/л ($n = 10$), $2,77 \pm 0,19$ ед. ($n = 10$) и $42,13 \pm 3,76$ мин ($n = 8$) соответственно, а в группе CLP-перитонит + nor-NOHA – $1,516 \pm 0,031$ г/л ($n = 10$), $3,49 \pm 0,13$ ед. ($n = 10$) и $54,04 \pm 2,47$ мин ($n = 8$) соответственно. Изменение содержания СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс после CLP-операции в условиях депрессии аргиназы печени с помощью nor-NOHA представлено в табл. 3.

Таблица 3. Изменение содержания СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс после CLP-перитонита в условиях депрессии аргиназы печени с помощью nor-NOHA

Table 3. Changes in MM in blood plasma, DBT and DDS in rats after CLP-peritonitis under the conditions of liver arginase depression using nor-NOHA

Группа животных	СМ, г/л	СТК, ед.	ПНС, мин
1. Интактные	0,726 ± 0,016 (n = 10)	1,28 ± 0,12 (n = 10)	28,28 ± 3,21 (n = 8)
2. ЛО	0,734 ± 0,018 $p_{2-1} > 0,05$ (n = 10)	1,31 ± 0,13 $p_{2-1} > 0,05$ (n = 10)	29,62 ± 3,37 $p_{2-1} > 0,05$ (n = 8)
3. CLP-перитонит	1,248 ± 0,028 $p_{3-1} < 0,001$ $p_{3-2} < 0,001$ (n = 10)	2,95 ± 0,19 $p_{3-1} < 0,001$ $p_{3-2} < 0,001$ (n = 10)	42,47 ± 4,26 $p_{3-1} < 0,05$ $p_{3-2} < 0,05$ (n = 8)
4. Контроль + ФР	0,744 ± 0,015 $p_{4-1} > 0,05$ (n = 10)	1,30 ± 0,10 $p_{4-1} > 0,05$ (n = 10)	29,09 ± 2,89 $p_{4-1} > 0,05$ (n = 8)
5. Контроль + nor-NOHA	0,983 ± 0,018 $p_{5-1} < 0,001$ $p_{5-4} < 0,001$ (n = 10)	1,74 ± 0,10 $p_{5-1} < 0,05$ $p_{5-4} < 0,05$ (n = 10)	39,63 ± 3,23 $p_{5-1} < 0,05$ $p_{5-4} < 0,05$ (n = 8)
6. ЛО + ФР	0,731 ± 0,017 $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$ (n = 10)	1,34 ± 0,11 $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$ (n = 10)	29,27 ± 3,03 $p_{6-2} > 0,05$ $p_{6-4} > 0,05$ (n = 8)
7. ЛО + nor-NOHA	1,003 ± 0,016 $p_{7-2} < 0,001$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} < 0,001$ (n = 10)	1,78 ± 0,11 $p_{7-2} < 0,05$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} < 0,05$ (n = 10)	40,05 ± 2,87 $p_{7-2} < 0,05$ $p_{7-5} > 0,05$ $p_{7-6} < 0,05$ (n = 8)
8. CLP-перитонит + ФР	1,288 ± 0,027 $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,001$ (n = 10)	2,77 ± 0,19 $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,001$ (n = 10)	42,13 ± 3,76 $p_{8-3} > 0,05$ $p_{8-6} < 0,05$ (n = 8)
9. CLP-перитонит + nor-NOHA	1,516 ± 0,031 $p_{9-3} < 0,001$ $p_{9-6} < 0,001$ $p_{9-7} < 0,001$ $p_{9-8} < 0,001$ (n = 10)	3,49 ± 0,13 $p_{9-3} < 0,05$ $p_{9-6} < 0,001$ $p_{9-7} < 0,001$ $p_{9-8} < 0,05$ (n = 10)	54,04 ± 2,47 $p_{9-3} < 0,05$ $p_{9-6} < 0,001$ $p_{9-7} < 0,01$ $p_{9-8} < 0,05$ (n = 8)

Таким образом, результаты выполненного исследования дают основание заключить, что развитие CLP-перитонита сопровождается более выраженными изменениями содержания общего ХС в печени и ЛП в сыворотке крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови, угнетением детоксикационной функции печени и развитием вторичной дислипотеинемии.

Проблеме нарушений обмена ХС ЛП плазмы крови при различных септических состояниях, действии бактериальных эндотоксинов посвящено большое количество работ отечественных и зарубежных авторов [2, 21–24]. Показано, что большинство патологических состояний, сопровождающихся бактериальной эндотоксинемией или бактериемией, вызывает заметную перестройку всех видов обмена, в том числе и липидного [23, 25–28]. Однако особенности гуморальной регуляции уровня ХС ЛП плазмы крови при бактериальной эндотоксинемии в условиях перитонита остаются невыясненными.

В последние годы установлено, что при целом ряде экстремальных состояний организма, включая эндотоксемию и септический шок, в гепатоцитах экспрессируется ген индуцибельной NO-синтазы [3]. Установлено, что при сепсисе в крови повышается уровень конечных продук-

тов элиминации NO [29]. Индуцированный в печени синтез NO существенным образом влияет на разнообразные физиологические процессы, в частности на способность гепатоцитов синтезировать так называемые белки «острой фазы», между уровнем которых в крови и детоксикационной функцией печени существует тесная взаимосвязь [4, 9, 30].

За последние несколько десятилетий стало ясно, что многие из проявлений печеночной дисфункции зависят и от активности аргиназы печени [4, 30]. Известно, что под влиянием бактериальных эндотоксинов активность аргиназы макрофагов, а также печени повышается [30–33]. Поскольку индуцированная при различных септических состояниях генерация NO обнаружена во всех типах печеночных клеток [34], принято считать, что это вещество участвует в большинстве физиологических и патологических процессов, протекающих в печени.

Следовательно, были основания полагать, что изменение активности аргиназы печени будет сказываться на синтезе NO, который играет важную роль в процессах жизнедеятельности, формировании метаболических процессов и, в частности, обмена ХС ЛП липопротеидов плазмы крови при действии бактериальных эндотоксинов.

Рядом исследователей установлено, что изменение уровня тиреоидных гормонов в крови тесно коррелирует с продукцией в организме NO, в процессах образования которого имеет значение и аргиназа печени [4]. Учитывая, что активность аргиназы печени лимитирует доступность L-аргинина для индуцибельной NO-синтазы, были основания полагать, что ее активность будет сказываться на процессе образования NO [5–8]. В нашем исследовании установлено, что в условиях депрессии аргиназы печени *por-NOHA* развитие CLP-перитонита сопровождалось более значимым снижением активности аргиназы и более выраженным повышением уровня NOx в плазме крови.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях экспериментального перитонита у крыс через 24 ч после CLP-операции снижаются активность аргиназы печени, уровень йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови, температура тела, повышается содержание NOx в плазме крови, развивается вторичная атерогенная дислипидопроteinемия. В выявленных изменениях при перитоните (CLP-модель) участвует аргиназа печени. Депрессия аргиназы печени усугубляет изменения содержания общего холестерина в печени и липопротеинах сыворотки крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови и способствует развитию вторичной дислипидопроteinемии, индуцированной экспериментальным перитонитом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Peritonites post operatoires: facteurs pronostiques de mortalite / Y. Marzougui [et al.] // Arch. Inst. Pasteur Tunis. – 2014. – Vol. 91, N 1–4. – P. 67–76.
2. Яковлев, М. Ю. Системная эндотоксинемия / М. Ю. Яковлев. – М.: Наука, 2021. – 184 с.
3. Metabolism via Arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages / M. Rath [et al.] // Front Immunol. – 2014. – N 5. – Art. ID 532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
4. Mori, M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling / M. Mori // J. Nutr. – 2007. – Vol. 137, N 6–2. – P. 1616S–1620S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1616S>
5. Thyroid status and nitric oxide in rat arterial vessels / R. M. McAllister [et al.] // J. Endocrinol. – 2005. – Vol. 185, N 1. – P. 111–119. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06022>
6. Nitric oxide synthase activity in hyperthyroid and hypothyroid rats / A. Quesada [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2002. – Vol. 147, N 1. – P. 117–122. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1470117>
7. Duntas, L. H. Renewed focus on the association between thyroid hormones and lipid metabolism / L. H. Duntas, G. Brenta // Front Endocrinol. (Lausanne). – 2018. – Vol. 9. – Art. ID 511. – P. 1–10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00511>
8. Бондарь, Т. Н. Тиреоидный статус организма и оксид азота / Т. Н. Бондарь // Анналы Мечников. ин-ту. – 2008. – № 3. – С. 8–12.
9. Pegg, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function / A. E. Pegg // IUBMB Life. – 2009. – Vol. 61, N 9. – P. 880–894. <https://doi.org/10.1002/iub.230>
10. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [Electronic resource]. – Mode of access: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&qid=1660822800456&from=EN>. – Date of access: 10.07.2024.
11. Ветеринарно-санитарные правила по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках // Нац. фонд техн.

норм. правовых актов Респ. Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.tnpa.by/#!/FileText/348641/250983>. – Дата доступа: 10.07.2024.

12. Моделирование экспериментального сепсиса путем выполнения лигирования и пункции слепой кишки (CLP-процедура) / Е. Ю. Шаповалова [и др.] // Ульянов. мед.-биол. журн. – 2020. – № 3. – С. 150–158.

13. Using the cecal ligation and puncture model of sepsis to induce rats to multiple organ dysfunction / J. M. C. Capcha [et al.] // Bio-protocol. – 2021. – Vol. 11, N 7. – P. e3979. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3979>

14. Burstein, M. Sur la clarification du sérum lipémique par l'héparine *in vitro* / M. Burstein, J. Samaille // C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. – 1955. – Vol. 241, N 9. – P. 664–665.

15. Крехова, М. А. Фракционное определение эфиров холестерина в крови и тканях с помощью хроматографии в тонком слое / М. А. Крехова, М. К. Чехранова // Вопр. мед. химии. – 1971. – Т. 17, № 1. – С. 93–98.

16. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma / H. Maarsingh [et al.] // Eur. Resp. J. – 2011. – Vol. 38, N 2. – P. 318–328. <https://doi.org/10.1183/09031936.00057710>

17. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation / H. Moshage [et al.] // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, N 6. – P. 892–896. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.6.892>

18. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.

19. Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях: а. с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50. / В. М. Моин [и др.]. – № 4323421/28-14; заяв. 02.11.87; опубл. 07.11.89 // Открытия. Изобретения. – 1989. – № 41. – С. 415.

20. Способ определения токсичности биологических жидкостей: а. с. 1146570 СССР, МКИ б ОI № 1/28 / О. А. Радькова [и др.]. – № 3458007/28-13; заяв. 18.06.84; опубл. 23.03.85 // Открытия. Изобретения. – 1985. – № 41. – С. 415.

21. Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis / A. Lekkou [et al.] // J. Crit. Care. – 2014. – Vol. 29, N 5. – P. 723–727. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.04.018>

22. HDL-S1P protects endothelial function and reduces lung injury during sepsis *in vivo* and *in vitro* / Y. Fan [et al.] // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2020. – Vol. 126. – Art. 105819. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105819>

23. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients / S. Tanaka [et al.] // Ann. Intensive Care. – 2019. – Vol. 9, N 1. – Art. 68. <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0541-8>

24. Гусаковская, Э. В. Характеристика изменений в организме крыс с острым экспериментальным перитонитом / Э. В. Гусаковская, Н. Е. Максимович // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2022. – Т. 29, № 1. – С. 91–97.

25. Amunugama, K. The lipid biology of sepsis / K. Amunugama, D. P. Pike, D. A. Ford // J. Lipid Res. – 2021. – Vol. 62. – Art. 100090. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100090>

26. Чепелева, Е. Н. Клетки Купфера в регуляции содержания холестерина в печени и липопротеинах крови, уровня йодосодержащих гормонов щитовидной железы в крови и температуры тела у крыс с экспериментальным перитонитом / Е. Н. Чепелева, Ф. И. Висмонт // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 4. – С. 391–401.

27. Changes in lipid metabolism in pediatric patients with severe sepsis and septic shock / A. C. G. Bermudes [et al.] // Nutrition. – 2018. – Vol. 47. – P. 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.09.015>

28. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation / S. Barlage [et al.] // Intensive Care Med. – 2009. – Vol. 35, N 11. – P. 1877–1885. <https://doi.org/10.1007/s00134-009-1609-y>

29. Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases / D. J. Stuehr // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1411, N 2–3. – P. 217–230. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00016-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00016-x)

30. MacMicking, J. Nitric oxide and macrophage function / J. MacMicking, Q. W. Xie, C. Nathan // Annu. Rev. Immunol. – 1997. – Vol. 15. – P. 323–350. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>

31. The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages / C. Marathe [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281, N 43. – P. 32197–32206. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605237200>

32. Чепелева, Е. Н. О значимости активности аргиназы печени и клеток Купфера в развитии вторичной атерогенной дислипидемии и формировании тиреоидного статуса у крыс с экспериментальным перитонитом / Е. Н. Чепелева, Ф. И. Висмонт // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 1. – С. 17–27.

33. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease / R. W. Caldwell [et al.] // Physiol. Rev. – 2018. – Vol. 98, N 2. – P. 641–665. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016>

34. Munder, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system / M. Munder // Br. J. Pharmacol. – 2009. – Vol. 158, N 3. – P. 638–651. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>

References

1. Marzougui Y., Missaoui K., Hannachi Z., Dhibi Y., Kouka J., Dziri C., Houissa M. Peritonites post operatoires: facteurs pronostiques de mortalite. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 2014, vol. 91, no. 1–4, pp. 67–76 (in French).

2. Yakovlev M. Yu. *Systemic endotoxemia*. Moscow, Nauka Publ., 2021. 184 p. (in Russian).

3. Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E. I., Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 2014, no. 5, art. ID 532, pp. 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>

4. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *Journal of Nutrition*, 2007, vol. 137, no. 6–2, pp. 1616S–1620S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1616S>

5. McAllister R. M., Albarracin I., Price E. M., Smith T. K., Turk J. R., Wyatt K. D. Thyroid status and nitric oxide in rat arterial vessels. *Journal of Endocrinology*, 2005, vol. 185, no. 1, pp. 111–119. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06022>
6. Quesada A., Sainz J., Wangenstein R., Rodriguez-Gomez I., Vargas F., Osuna A. Nitric oxide synthase activity in hyperthyroid and hypothyroid rats. *European Journal of Endocrinology*, 2002, vol. 147, no. 1, pp. 117–122. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1470117>
7. Duntas L. H., Brenta G. A renewed focus on the association between thyroid hormones and lipid metabolism. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2018, no. 9, art. ID 511, pp. 1–10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00511>
8. Bondar' T. N. An organism thyroid status and nitric oxide. *Annali Mechnikovskogo institutu* [Annals of Mechnikov Institute], 2008, no. 3, pp. 8–12 (in Russian).
9. Pegg A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 2009, vol. 61, no. 9, pp. 880–894. <https://doi.org/10.1002/iub.230>
10. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&qid=1660822800456&from=EN> (accessed 10.07.2024).
11. The animal health rules for the reception, care and dissection of the experimental animals in the vivarium research institutes, stations, laboratories, schools and nurseries. *National Fund of Technical Legal Acts of the Republic of Belarus*. Available at: <http://www.tnpa.by/#!/FileText/348641/250983> (accessed 10.07.2024) (in Russian).
12. Shapovalova E. Yu., Demyashkin G. A., Malanichev M. Yu., Pogosyan D. A., Zorin I. A., Shchekin V. I. Simulation of experimental sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). *Ul'yanovskii mediko-biologicheskii zhurnal* [Ulyanovsk medico-biological journal], 2020, no. 3, pp. 150–158 (in Russian).
13. Capcha J. M. C., Moreira R. S., Rodrigues C. E., Silveira M. A. D., Andrade L., Gomes S. A. Using the cecal ligation and puncture model of sepsis to induce rats to multiple organ dysfunction. *Bio-protocol*, 2021, vol. 11, no. 7, p. e3979. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3979>
14. Burstein M., Samaille J. Sur la clarification du sérum lipémique par l'héparine *in vitro*. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 1955, vol. 241, no. 9, pp. 664–665 (in French).
15. Krekhova M. A., Chekhranova M. K. Fractional determination of cholesterol esters in blood and tissues using thin layer chromatography. *Voprosy meditsinskoi khimii* [Medicinal chemistry issues], 1971, vol. 17, no. 1, pp. 93–98 (in Russian).
16. Maarsingh H., Dekkers B. G. J., Zuidhof A. B., Bos I. S. T., Menzen M. H., Klein T., Flik G., Zaagsma J., Meurs H. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. *European Respiratory Journal*, 2011, vol. 38, no. 2, pp. 318–328. <https://doi.org/10.1183/09031936.00057710>
17. Moshage H., Kok B., Huizenga J. R., Jansen P. L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clinical Chemistry*, 1995, vol. 41, no. 6, pp. 892–896. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.6.892>
18. Kamyshnikov V. S. *Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnostics. 3rd ed.* Moscow, MEDpress-inform Publ., 2009. 896 p. (in Russian).
19. Moin V. M., Nikolaichik V. V., Kirkovskii V. V., Lobacheva G. A., Mazur L. I. The method for determining the group of substances of middle molecules in biological fluids. A. s. 1520445 SSSR, VRB F 01 no. 33/50. *Otkrytiya. Izobreteniya* [Discoveries. Inventions], 1987, no. 41, p. 415 (in Russian).
20. Rad'kova O. A., Boyarinov G. A., Balishina I. N., Krylov K. V. A method for determining the toxicity of biological fluids. A. s. 1146570 SSSR, MKI b Ol no. 1/28. *Otkrytiya. Izobreteniya* [Discoveries. Inventions], 1985, no. 11. 616 p. (in Russian).
21. Lekkou A., Mouzaki A., Siagris D., Ravani I., Gogos C. A. Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis. *Journal of Critical Care*, 2014, vol. 29, no. 5, pp. 723–727. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.04.018>
22. Fan Y., Chen J., Liu D., Li W., Wang H., Huang Y., Gao C. HDL-S1P protects endothelial function and reduces lung injury during sepsis *in vivo* and *in vitro*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2020, vol. 126, art. 105819. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105819>
23. Tanaka S., Diallo D., Delbosc S., Genève C., Zappella N., Yong-Sang J. [et al.]. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. *Annals of Intensive Care*, 2019, vol. 9, no. 1, art. 68. <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0541-8>
24. Gusakovskaya E. V., Maksimovich N. E. Characteristics of changes in rats with acute experimental peritonitis. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of Grodno State Medical University], 2022, vol. 20, no. 1, pp. 91–97 (in Russian).
25. Amunugama K., Pike D. P., Ford D. A. The lipid biology of sepsis. *Journal of Lipid Research*, 2021, vol. 62, art. 100090. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100090>
26. Chepeleva E. N., Vismont F. I. Kupffer cells in the regulation of the cholesterol content in the liver and the blood lipoproteins, the level of iodine-containing thyroid hormones in the blood and the body temperature in rats with experimental peritonitis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 4, pp. 391–401 (in Russian).
27. Bermudes A. C. G., de Carvalho W. B., Zamberlan P., Muramoto G., Maranhão R. C., Delgado A. F. Changes in lipid metabolism in pediatric patients with severe sepsis and septic shock. *Nutrition*, 2018, vol. 47, pp. 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.09.015>
28. Barlage S., Gnewuch C., Liebisch G., Wolf Z., Audebert F. X., Glück T., Fröhlich D., Krämer B. K., Rothe G., Schmitz G. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Medicine*, 2009, vol. 35, no. 11, pp. 1877–1885. <https://doi.org/10.1007/s00134-009-1609-y>

29. Stuehr D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, vol. 1411, no. 2–3, pp. 217–230. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00016-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00016-x)
30. MacMicking J., Xie Q. W., Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, 1997, vol. 15, pp. 323–350. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>
31. Marathe C., Bradley M. N., Hong C., Lopez F., Ruiz de Galarreta C. M., Tontonoz P., Castrillo A. The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, no. 43, pp. 32197–32206. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605237200>
32. Chepeleva E. N., Vismont F. I. On the significance of the activity of liver arginase and Kupffer cells in the development of secondary atherogenic dyslipidemia and the formation of thyroid status in rats with experimental peritonitis. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 1, pp. 17–27 (in Russian).
33. Caldwell R. W., Rodriguez P. C., Toque H. A., Narayanan S. P., Caldwell R. B. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiological Reviews*, 2018, vol. 98, no. 2, pp. 641–665. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016>
34. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal of Pharmacology*, 2009, vol. 158, no. 3, pp. 638–651. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>

Информация об авторах

Чепелева Елена Николаева – ст. преподаватель. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: drhelen1993@gmail.com

Висмонт Франтишек Иванович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by

Information about the authors

Elena N. Chepeleva – Senior Lecturer. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: drhelen1993@gmail.com

Frantishek I. Vismont – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.by

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 575.174.015.3:575.175.852:[616.98:578.834.1]-036.1

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-294-304>

Поступила в редакцию 29.04.2023

Received 29.04.2023

**Н. В. Матиевская¹, Е. В. Кузнецова¹, П. М. Морозик²,
В. И. Козловский¹, О. В. Горчакова¹**

¹Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

²Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВУЮ СИСТЕМУ, И ГЕНА *LZTFL1* С ТЯЖЕСТЬЮ ТЕЧЕНИЯ SARS-CoV-2

Аннотация. Цель исследования – установить ассоциацию ряда вариантов генов, вовлеченных в ренин-ангиотензиновую систему, с тяжестью течения SARS-CoV-2-инфекции.

В исследование было включено 206 госпитализированных пациентов с COVID-19, разделенных на две группы: 1-я группа – 99 пациентов с тяжелой формой COVID-19; 2-я группа – 107 пациентов со средней и легкой формами заболевания. Анализ полиморфных вариантов генов *ACE* rs4646994, *ACE2* rs2074192, rs2285666 и rs413031713 и *LZTFL1* rs10490770 осуществляли с помощью количественной ПЦР с зондами TaqMan («Праймтех», Беларусь) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Варианты генов *AGT* rs699 и *AGTR1* rs5186 определяли на приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколами производителя наборов реагентов («Литех», Россия).

Установлено, что генетическими маркерами тяжелого течения COVID-19 среди белорусских пациентов являются гетерозиготный генотип *LZTFL1* rs10490770 T/C, а также гаплотип A-A по локусам *ACE2* rs2074192 и rs2285666 и аллельная комбинация A-A-C по локусам *ACE2* rs2074192, *ACE2* rs2285666 и *AGT* rs699. Выявлены генетические маркеры, ассоциированные с легкой/средней тяжестью течения COVID-19: гетерозиготный вариант *AGTR1* rs5186 A/C, аллельная комбинация G-G-T по локусам *ACE2* rs2074192 и rs2285666, *AGT* rs699 (у носителей этих вариантов генов снижен риск тяжелого течения заболевания).

Таким образом, локусы генов, вовлеченных в регуляцию ренин-ангиотензиновой системы (*ACE2* rs2074192 и rs2285666, *AGTR1* rs5186) и гена *LZTFL1* rs10490770, а также их гаплотипы являются информативными маркерами для прогнозирования тяжести течения COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, *ACE2* rs2074192, *ACE2* rs2285666, *AGT* rs699, *LZTFL1* rs10490770, *AGTR1* rs5186, ренин-ангиотензиновая система

Для цитирования: Ассоциация полиморфизма генов, кодирующих ренин-ангиотензиновую систему, и гена *LZTFL1* с тяжестью течения SARS-CoV-2 / Н. В. Матиевская [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2024. – Т. 21, № 4. – С. 294–304. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-294-304>

**Natalia V. Matsiyenskaya¹, Katsiaryna U. Kuzniatsova¹, Pavel M. Marozik²,
Valery I. Kozlovski¹, Volha U. Harchakova¹**

¹Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

²Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

ASSOCIATION OF THE POLYMORPHISM OF THE GENES CODING THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM AND THE *LZTFL1* GENE WITH THE SEVERITY AND OUTCOMES OF SARS-CoV-2 INFECTION

Abstract. The aim of the study is to establish the association of variants of a number of genes involved in the renin-angiotensin system with the severity of SARS-CoV-2 infection.

The study included 206 hospitalized patients with COVID-19: Group 1 – 99 patients with severe COVID-19; Group 2 – 107 with moderate and mild forms of the disease.

Polymorphic variants of the *ACE* rs4646994, *ACE2* rs2074192 rs2285666 and rs413031713 and *LZTFL1* rs10490770 genes were analyzed using quantitative PCR with TaqMan probes (Primetech, Belarus) on a CFX96 thermocycler (Bio-Rad, USA). *AGT* rs699 and *AGTR1* rs5186 gene variants were determined using a Rotor-Gene Q thermocycler (QIAGEN, Germany), in accordance to the protocols of the manufacturer (Litekh, Russia).

We revealed that the genetic markers of the severe COVID-19 infection in the Belarusian patients are the heterozygous T/C genotype of the *LZTFL1* rs10490770 variant, as well as the A-A haplotype of the *ACE2* rs2074192 and rs2285666 loci, and the A-A-C allelic combination of the *ACE2* rs2074192, rs2285666 and *AGT* rs699 genes. Genetic markers associated with mild/moderate severity of COVID-19 were also identified: heterozygous A/C genotype of the *AGTR1* rs5186 variant, G-G-T allelic combination at the *ACE2* rs2074192 and rs2285666, *AGT* rs699 loci (among carriers of these gene variants, the risk of severe disease is reduced).

The loci of the genes encoding the renin-angiotensin system – *ACE2* rs2074192 and rs2285666, *AGTR1* rs5186, and the *LZTFL1* rs10490770 genes, as well as allelic combinations between the *ACE2* rs2074192, rs2285666 and *AGT* rs699 loci are informative markers for predicting the severity of COVID-19.

Keywords: COVID-19, *ACE2* rs2074192, *ACE2* rs2285666, *AGT* rs699, *LZTFL1* rs10490770, *AGTR1* rs5186, renin-angiotensin system

For citation: Matsiyuskaya N. V., Kuzniatsova K. U., Marozik P. M., Kozlovski V. I., Harchakova V. U. Association of the polymorphism of the genes coding the renin-angiotensin system and the *LZTFL1* gene with the severity and outcomes of SARS-CoV-2 infection. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seryya medytsynskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 4, pp. 294–304 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-294-304>

Введение. Коронавирусная инфекция COVID-19 характеризуется широким спектром клинических проявлений – от бессимптомного до крайне тяжелого. Генетические факторы играют важную роль в восприимчивости к инфекциям, а также определяют тяжесть течения и исходы инфекционных заболеваний. Так, разнообразие клинических проявлений COVID-19 во многом обусловлено именно индивидуальными генетическими особенностями. Среди вероятных генетических маркеров тяжести течения COVID-19 в настоящее время рассматриваются полиморфные локусы различных генов, в том числе кодирующих ренин-ангиотензиновую систему (РАС). РАС играет одну из ключевых ролей в патогенезе COVID-19, формировании таких тяжелых осложнений, как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), сердечно-сосудистая недостаточность и др. Гиперактивация РАС у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями в условиях COVID-19 приводит не только к более тяжелому течению инфекции, но и к неблагоприятным исходам [1].

У человека и других млекопитающих РАС играет ключевую роль в регуляции артериального давления, водно-солевого баланса, а также участвует в патогенезе воспаления. Ключевые компоненты РАС – ангиотензин-превращающие ферменты (АСЕ и АСЕ2) – по своей структуре гомологичны на 60 %, но при этом их активация приводит к противоположным эффектам. Ренин секретируется в кровотоке в ответ на гипотензию или гипернатриемию. Активная форма ренина расщепляет альфа-глобулин ангиотензиноген (полипептид длиной 118 аминокислот), образуя ангиотензин (АТ) I, который далее расщепляется АСЕ до октапептида – АТ II, оказывающего неблагоприятные сосудосуживающие и профибротические эффекты. АСЕ экспрессируется всеми эпителиальными клетками человеческого организма, основная доля синтезируется легкими. Экспрессия АСЕ2 отмечена преимущественно альвеоцитами I типа, а также кардиомиоцитами, холангиоцитами, колоноцитами толстого кишечника, эпителиальными клетками желудка, подвздошной и прямой кишки, проксимальных канальцев почек, мочевого пузыря. Мембранная форма АСЕ2 играет центральную роль в синтезе сердечно-сосудистого защитного гептапептида, который ограничивает неблагоприятные эффекты АТ II и проявляет сосудорасширяющее, антипролиферативное, противовоспалительное и антифибротическое действие. На активность РАС влияют в том числе и различные генетические факторы, а нарушение баланса между компонентами этой системы лежит в основе патогенеза развития артериальной гипертензии (АГ) [3].

Ген *ACE* локализован в 17-й хромосоме (17q23.3). В ряде исследований показана ассоциация полиморфных вариантов гена *ACE* с патогенезом COVID-19 [1, 2]. Одним из таких маркеров является полиморфный локус rs4340 (Alu I/D), представляющий собой вставку (инсерцию, I) или потерю (делецию, D) повторяющегося участка Alu. Делеция способствует повышению экспрессии гена *ACE* и уровня фермента в сыворотке и тканях. Вследствие этого у носителей генотипа D/D повышен риск развития гипертонической болезни. Кроме того, показана ассоциация данного полиморфного варианта с развитием атеросклероза, инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца (ИБС). Так, в одном исследовании установлено, что в польской популяции частота аллеля D варианта *ACE* rs4340 выше у пациентов с ИБС [3]. В другом исследовании показано, что полиморфный вариант I/D гена *ACE* (rs4646994) ассоциирован с риском развития гипертензии, сердечно-сосудистых и респираторных заболеваний, при этом генотип D/D связан с тяжестью заболевания, но не с восприимчивостью к инфекции [4]. В то же время в чешской популяции более тяжелое течение SARS-CoV-2 выявлено среди носителей генотипа I/I [5].

Ген *ACE2*, отвечающий за синтез ACE2, локализован в X-хромосоме. Полиморфные варианты в этом гене способствуют изменению уровня фермента в сыворотке крови, тем самым влияя на вирусную нагрузку SARS-CoV-2 (к настоящему времени выявлено более 20 таких полиморфных вариантов) [6, 7]. Показано, что уровень ACE2 ниже у лиц – носителей С-аллеля варианта *ACE2* rs190509934, вследствие чего сделано предположение, что повышенная экспрессия ACE2 может частично защищать от инфекции SARS-CoV-2 [8].

Предшественником АТ II является АТ I, образующийся из ангиотензиногена под действием ренина. Ген, кодирующий синтез ангиотензиногена (*AGT*) расположен в 1-й хромосоме (1q42). Некоторые полиморфные варианты гена *AGT* (rs699 и rs4762) ассоциированы с динамикой уровня ангиотензиногена в крови. Установлена связь указанных полиморфных локусов с развитием гипертонической болезни и других сердечно-сосудистых заболеваний [3]. На сегодняшний день известно более 15 полиморфных вариантов гена *AGT*, большинство из которых способствует изменению аминокислотной последовательности. С уровнем ангиотензиногена в крови ассоциирован вариант 4072Т>С (rs699) гена *AGT*. Носительство генотипа С/С связано с повышенным уровнем ангиотензиногена и развитием АГ [9, 10]. В то же время пилотные исследования показали, что С-аллель варианта rs699 гена *AGT* сопряжен с риском тяжелого течения COVID-19 [11, 12].

Ген *AGTR1*, кодирующий синтез рецепторов первого типа к АТ II, расположенных в эндотелиальных клетках сосудов, локализован в 3-й хромосоме (3q24). Наряду с другими компонентами РАС ген *AGTR1* участвует в регуляции артериального давления. Выявлена ассоциация полиморфного варианта rs5186 гена *AGTR1* с повышенной чувствительностью рецепторов I типа к нормальному уровню АТ II, что ассоциировано с повышенным артериальным давлением. При этом частота встречаемости аллеля С выше у пациентов с АГ, чем у здоровых лиц [3]. Большое клиническое значение имеет также вариант rs5186 *AGTR1*: С-аллель связан с повышенным риском АГ [13] и тяжестью течения COVID-19 [14].

Ген *LZTFL1*, расположенный в 3-й хромосоме (локус 3p21.31), экспрессируется в легочной ткани и отвечает за продукцию белка, обеспечивающего транспорт к первичным ресничкам клеток мерцательного эпителия. Выполненные исследования показали, что изменения в гене *LZTFL1* приводят к двукратному увеличению риска дыхательной недостаточности и летального исхода у лиц моложе 60 лет при COVID-19 [15, 16].

Высокая генетическая вариабельность протекания коронавирусной инфекции в различных популяциях и этнических группах определила цель настоящего исследования – установить ассоциацию вариантов генов, вовлеченных в ренин-ангиотензиновую систему, с тяжестью течения SARS-CoV-2-инфекции у белорусских пациентов.

Материалы и методы исследования. В исследование было включено 206 пациентов, которые проходили лечение на базе областной инфекционной клинической больницы г. Гродно в период с июля 2020 г. по август 2021 г. Критерии включения пациентов в исследование: наличие подтвержденного лабораторными методами COVID-19 в соответствии с действующими нормативными документами, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Беларусь (Приказ МЗ РБ от 11.11.2021, № 1424), возраст старше 18 лет, наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом Гродненской областной инфекционной клинической больницы.

Для проведения молекулярно-генетических исследований использовали образцы ДНК пациентов, выделенные из плазмы крови, полученной с использованием вакуумных систем с ЭДТА методом фенольной экстракции («ДНК-Технология», РФ). Качественную и количественную оценку содержания ДНК осуществляли на спектрофотометре Spectro Star Nano (BMG LABTECH, Германия). Анализ полиморфных вариантов генов *ACE* rs4646994, *ACE2* rs2074192, rs2285666, rs413031713 и *LZTFL1* rs10490770 осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с зондами TaqMan («Праймтех», Беларусь) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Полный объем реакции в пробирках для ПЦР составлял 10 мкл, включая 5 мкл iTaq Universal Probes Supermix (BioRad), 3,75 мкл воды milliQ, 0,25 мкл зондов, 1 мкл геномной ДНК (15 нг). Реакцию проводили с начальной денатурацией при 95 °С в течение 10 мин, затем 40 циклов денатурации при 95 °С в течение 15 с, отжига и синтеза при 60 °С в течение 30 с. Во время каждой

постановки ПЦР применяли положительный и отрицательный контроли. Варианты генов *AGT* rs699 и *AGTR1* rs5186 определяли на приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколами производителя наборов реагентов («Литех», Россия).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы R (<http://www.r-project.org/>) для Windows с помощью дополнительных пакетов для анализа генетических данных SNPassoc (версия 1.9-2). Наблюдаемые частоты генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (РХВ) с помощью χ^2 -критерия Пирсона. Для оценки ассоциации исследуемых вариантов генов с риском тяжелого течения COVID-19 применяли коэффициент отношения шансов (OR) с 95%-м доверительным интервалом. Для оценки различий между количественными и качественными показателями пациентов исследуемых групп использовали линейную и логистическую регрессии соответственно. Логистическую регрессию применяли также для сравнения частот аллелей, генотипов и гаплотипов в исследуемых группах. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

Результаты и их обсуждение. Всего в исследование было включено 206 пациентов с инфекцией COVID-19. Все пациенты были разделены на две группы исходя из тяжести течения инфекции: 1-я группа – 99 пациентов с тяжелой формой COVID-19, 2-я группа – 107 пациентов со средней и легкой формами заболевания. Клинические и лабораторные показатели пациентов исследуемых групп представлены в табл. 1.

Таблица 1. Клинико-лабораторные характеристики пациентов в группах исследования

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of study subjects

Показатель	1-я группа (n = 99)	2-я группа (n = 107)
Возраст, лет	64,0 (54,0; 71,0)	61,0 (57,0; 68,0)
Мужской пол, n (%)	51 (52)	48 (45)
Женский пол, n (%)	48,0 (48)	59 (55)
Койко-дни	19,0 (15,0; 27,3)**	12,0 (9,0; 14,0)
АГ, n (%)	81 (81,8)	88 (82,2)
Нарушение ритма, n (%)	20 (20,2)	13 (12,1)
Хронические заболевания легких, n (%)	15 (15,2)*	3 (2,8)
Хронические заболевания почек, n (%)	26 (26,3)*	15 (14)
ИБС, n (%)	66 (66,6)	68 (64)
Сахарный диабет, n (%)	36 (35 %)*	14 (13,1)
ИзМТ, n (%)	86 (86,9)	89 (83,2)
O ₂ -терапия, n (%)	74 (74,5)*	56 (52)
Лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии, n (%)	47 (47,5)*	1 (0,93)
ОРДС, n (%)	60 (60,6)*	3 (2,8)
ИВЛ/НИВЛ, n (%)	28 (28,3)*	1 (0,93)
Летальный исход, n (%)	18 (17)	0
Ферритин, нг/мл	804,0 (190,5; 1306,0)**	365,0 (112,0; 530,0)
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	690,5 (541,0; 1034,0)**	467,5 (369,0; 633,0)
IL-6 (пг/мл)	38,5 (15,0; 108,5)	19,2 (8,0; 85,9)
C-реактивный белок	76 (36,8; 134,0)**	29,0 (10,0; 59,0)

Примечание. Достоверность различий ($p < 0,05$): * – тест χ^2 ; ** – U-критерий Манна–Уитни. ИзМТ – избыточная масса тела, ИВЛ – инвазивная вентиляция легких, НИВЛ – неинвазивная вентиляция легких.

Как видно из представленных в табл. 1 данных, пациенты в группах исследования не различались по возрасту, полу, частоте сопутствующей патологии (ИБС, АГ, нарушения сердечного ритма, ИзМТ). В то же время у пациентов 1-й группы чаще отмечались сахарный диабет, хронические заболевания легких, хронические заболевания почек. Закономерно, что у пациентов

1-й группы наблюдались более высокие показатели основных маркеров тяжести течения COVID-19 – С-реактивного белка, ферритина, лактатдегидрогеназы, а также чаще проводилась инвазивная и/или неинвазивная вентиляция легких. ОРДС значительно чаще развивался у пациентов 1-й группы, в связи с чем они чаще проходили лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Общее количество пациентов с ИзМТ не различалось достоверно в группах сравнения ($p > 0,05$). Однако в 1-й группе пациентов с ожирением 3-й степени было больше, чем во 2-й: 17 (17,2 %) и 7 (6,5 %) соответственно, $p < 0,05$.

В табл. 2 представлены результаты сравнительного анализа частоты аллелей проанализированных локусов генов *ACE2* rs2074192, rs2285666, rs41303171 и *LZTFL1* rs10490770 с данными базы GnomAD для европейской популяции.

Таблица 2. Частота минорных аллелей (MAF) включенных в исследование вариантов генов и отклонение от ожидаемого равновесия Харди–Вайнберга

Table 2. Minor allele frequency (MAF) of gene variants included in the study and deviation from the expected Hardy–Weinberg equilibrium

Ген, вариант	Локализация GRCh38.p12	Минорный аллель	MAF	MAF в базе GnomAD	Гетерозиготность		PXB, p
					наблюдаемая	ожидаемая	
<i>LZTFL1</i> rs10490770	g.45823240 T>C	C	0,01	0,08	0,29	0,28	0,43
<i>ACE2</i> rs2074192	g.15564667 C>T	T	0,4	0,45	0,23	0,35	<0,0001
<i>ACE2</i> rs2285666	g.15610348 C>T	T	0,23	0,22	0,14	0,32	<0,0001
<i>ACE2</i> rs41303171	g.15564175 T>C	C	0,02	0,02	0,02	0,03	0,054

Примечание. MAF – частота минорного аллеля, PXB – равновесие Харди–Вайнберга.

Как видно из табл. 2, результаты генотипирования по генетическим маркерам *LZTFL1* rs10490770 и *ACE2* rs41303171 соответствуют ожидаемому PXB на уровне 5 % в общей группе ($p > 0,05$ для всех вариантов генов). Для локусов *ACE2* rs2074192 и rs2285666 наблюдаемая гетерозиготность отличается от ожидаемого PXB, что могло быть обусловлено тем, что когорта исследования являлась не популяционной выборкой, а изолированной группой пациентов.

Результаты анализа распределения частот генотипов полиморфного варианта I/D rs4646994 в гене *ACE* у пациентов в группах исследования представлены в табл. 3.

Таблица 3. Распределение частот генотипов по варианту *ACE* rs4646994 у пациентов с коронавирусной инфекцией

Table 3. *ACE* rs4646994 genotypes distribution among patients with coronavirus infection

Полиморфный вариант	Генотип	1-я группа ($n = 99$)	2-я группа ($n = 107$)	OR (95 % CI)	p
<i>ACE</i> rs4646994	I/I	25,3	27,8	1	0,84
	I/D	53,9	49,5	1,2 (0,6–2,4)	
	D/D	20,8	22,7	1,0 (0,4–2,3)	

Как видно из данных, представленных в табл. 3, у белорусских пациентов не выявлено статистически достоверной ассоциации варианта rs4646994 с тяжестью течения коронавирусной инфекции. Следует отметить, что не выявлено ассоциации как при использовании мультипликативной модели наследования (анализ аллелей), так и при использовании общей модели наследования (анализ генотипов).

Ранее в аналогичных исследованиях среди иракских пациентов также не выявлено статистически достоверной ассоциации указанного маркера с тяжестью инфекции COVID-19 [17]. В то же время выраженная ассоциация установлена исследователями из Саудовской Аравии [18].

Наблюдаемые различия могут быть обусловлены тем, что в исследовании [18] использовали в качестве контроля здоровых лиц, не болевших COVID-19, в то время как в настоящем исследовании сравнительный анализ проводился между пациентами как с тяжелой, так и со средней/легкой формой заболевания.

В исследование также были включены следующие локусы гена *ACE2*: rs2074192, rs2285666 и rs413031713. Включение сразу трех полиморфных маркеров этого гена обусловлено тем, что *ACE2* является рецептором для SARS-CoV-2. Внедрение вируса SARS-CoV-2 в клетки-мишени происходит за счет взаимодействия поверхностных S-белков возбудителя и мембраносвязанной формой *ACE2* клеток хозяина, в которых далее происходит репликация вируса. Вирус не только использует *ACE2* в качестве рецептора, но и моделирует его активность, снижая экспрессию *ACE2* в тканях, что приводит к накоплению АТ II. В условиях инфекции SARS-CoV-2 повышенная концентрация АТ II запускает синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, вызывая гипериммунный ответ, характеризующийся повышенной продукцией IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL8 и других провоспалительных цитокинов через взаимодействие с рецепторами AGTR1 и AGTR2. В результате этих процессов происходит повреждение альвеолоцитов и эндотелиоцитов, развиваются интерстициальный отек и инфильтрация легочной ткани, эндотелиальная дисфункция, гиперкоагуляция [2].

В табл. 4 представлены результаты анализа ассоциации вариантов гена *ACE2* rs2074192, rs2285666 и rs413031713 с тяжестью течения коронавирусной инфекции.

Таблица 4. Распределение частот генотипов по вариантам *ACE2* rs2074192, rs2285666 и rs413031713 у пациентов с коронавирусной инфекцией

Table 4. Distribution of *ACE2* rs2074192, rs2285666 and rs413031713 genotype frequencies among patients with coronavirus infection

Вариант <i>ACE2</i>	Генотип	1-я группа (n = 99)	2-я группа (n = 107)	OR (95 % CI)	p
rs2074192	G/G	43,6	53,3	1,0	0,36
	G/A	22,8	20,0	1,4 (0,7–2,8)	
	A/A	33,6	26,7	1,6 (0,8–2,9)	
rs2285666	G/G	62,0	72,4	1,0	0,18
	G/A	14,0	13,3	1,2 (0,8–1,9)	
	A/A	24,0	14,3	1,9 (0,95–4,1)	
rs413031713	T/T	96,8	97,1	1,0	0,45
	T/C	2,1	2,9	0,7 (0,1–4,4)	
	C/C	1,1	–	–	

Анализ представленных в табл. 4 данных не позволил выявить статистически значимой ассоциации указанных локусов с тяжестью течения коронавирусной инфекции. Тем не менее следует отметить, что в группе пациентов с тяжелым течением заболевания частота аллеля А по локусам *ACE2* rs2074192 (45 %) и rs2285666 (31 %) существенно выше, чем у пациентов со средней тяжестью течения заболевания (37 и 21 % соответственно).

С целью выявления потенциальных межгенных взаимодействий проведен комплексный анализ гаплотипов между этими двумя локусами (табл. 5).

Комплексный анализ по двум маркерам гена *ACE2* позволил выделить 4 аллельных комбинации, частота встречаемости которых в исследуемой группе составила более 3 % (табл. 5). Значение *p* глобального распределения гаплотипов составило 0,043, что в целом свидетельствует об ассоциации локусов *ACE2* rs2074192 и rs2285666 с анализируемым признаком.

Для аллельной комбинаций А-А выявлены статистически значимые различия в частоте встречаемости в разных группах в зависимости от тяжести заболевания. Наиболее распространенной аллельной комбинацией была G-G, общая частота которой составила 38,1 % в объединенной когорте. Частота комбинации А-А (общая частота 4,7 %) в группе пациентов с тяжелой формой коронавирусной инфекции была значительно выше, чем референсной комбинации G-G (OR = 3,1; 95 % ДИ 1,1–8,6; *p* = 0,031). Таким образом, для двух маркеров *ACE2* rs2074192 и rs2285666 установлена наиболее выраженная ассоциация с тяжестью протекания инфекции (табл. 5). Стати-

стически достоверной ассоциации для аллельных комбинаций G-A и A-G не выявлено ($p > 0,05$ во всех случаях).

В табл. 6 представлены результаты анализа ассоциации генетических локусов *AGT* rs699 и *AGTR1* rs5186 с тяжестью течения коронавирусной инфекции.

Таблица 5. Ассоциация гаплотипов *ACE2* rs2074192 и rs2285666 с тяжестью течения коронавирусной инфекции

Table 5. *ACE2* rs2074192 and rs2285666 haplotype association with the severity of coronavirus infection

Гаплотип rs2074192–rs2285666	Частота выявления, %			OR (95 % CI)	<i>p</i>
	Общая	1-я группа (<i>n</i> = 99)	2-я группа (<i>n</i> = 107)		
G-G	38,1	32,0	43,7	1,0	–
A-G	36,1	37,1	35,4	1,3 (0,9–1,9)	0,18
G-A	21,1	23,0	19,7	1,4 (0,9–2,1)	0,14
A-A	4,7	7,9	1,2	3,1 (1,1–8,6)	0,031

Таблица 6. Распределение частот генотипов по вариантам *AGT* rs699 и *AGTR1* rs5186 у пациентов с коронавирусной инфекцией

Table 6. Distribution of genotype frequencies of *AGT* rs699 and *AGTR1* rs5186 variants among patients with coronavirus infection

Полиморфный вариант	Генотип	1-я группа	2-я группа	OR (95 % CI)	<i>p</i>
<i>AGT</i> rs699	T/T	22,1	25,3	1,0	0,17
	T/C	47,4	54,9	0,7 (0,4–1,3)	
	C/C	30,5	19,8	1,8 (0,9–3,5)	
<i>AGTR1</i> rs5186	A/A	51,6	38,5	1,0	0,01
	A/C	35,8	56,0	0,5 (0,3–0,9)	
	C/C	12,6	5,5	1,7 (0,6–5,3)	

Анализ данных, представленных в табл. 6, не позволил выявить статистически значимой ассоциации локуса *AGT* rs699 с тяжестью течения коронавирусной инфекции. Следует отметить тот факт, что частота гомозиготного генотипа C/C существенно выше у лиц с тяжелой формой течения заболевания (30,5 % vs 19,8 %), однако эта разница недостоверна ($p = 0,17$).

В то же время статистически значимая ассоциация выявлена для локуса *AGTR1* rs5186. Так, частота носителей гетерозиготного варианта *AGTR1* rs5186 A/C была существенно выше в группе пациентов с легкой/средней формой течения заболевания (OR = 0,5, $p = 0,01$).

Чтобы избежать влияния сопутствующей патологии на возможную ассоциацию с тяжестью течения заболевания, в дальнейшем результаты исследований были скорректированы по показателям «диабет», «сердечно-сосудистая патология» и «хроническая обструктивная болезнь легких». Результаты представлены в табл. 7.

Анализ распределения частот генотипов по локусу *AGT* rs699 с коррекцией по сопутствующей клинической патологии не позволил выявить статистически значимой ассоциации с риском тяжелого течения коронавирусной инфекции ($p = 0,14$). Для локуса *AGTR1* rs5186 выявлена ассоциация при использовании рецессивной модели наследования: у носителей комбинации генотипов A/C + C/C риск тяжелого течения коронавирусной инфекции статистически значимо повышен (OR = 4,4; 95 % ДИ 1,2–15,4; $p = 0,015$).

В табл. 8 представлены результаты комплексного анализа аллельных комбинаций между тремя локусами – *ACE2* rs2074192, rs2285666 и *AGT* rs699.

Комплексный анализ по трем локусам двух генов позволил выделить 8 аллельных комбинаций (табл. 8). Значение *p* глобального распределения гаплотипов составило 0,015, что в целом свидетельствует об ассоциации локусов *ACE2* rs2074192, rs2285666 и *AGT* rs699 с анализируемым признаком.

Кроме того, результаты позволили установить аллельную комбинацию G-G-T, для носителей которой риск тяжелого течения коронавирусной инфекции существенно снижен (OR = 0,4; 95 % ДИ 0,2–0,8; $p = 0,018$), а также комбинацию A-A-C, для носителей которой риск тяжелой формы заболевания существенно возрастает (OR = 4,2; 95 % ДИ 1,1–9,4; $p < 0,0001$).

Таблица 7. Распределение частот генотипов по вариантам *AGT* rs699 и *AGTRI* rs5186 у пациентов в зависимости от тяжести протекания коронавирусной инфекции, скорректированного по сопутствующим заболеваниям

Table 7. Distribution of genotype frequencies of *AGT* rs699 and *AGTRI* rs5186 variants among patients depending on the severity of coronavirus infection, adjusted for comorbidities

Полиморфный вариант	Генотип	1-я группа	2-я группа	OR (95 % CI)	<i>p</i>
<i>AGT</i> rs699	T/T	21,2	25,3	1,0	0,14
	T/C	47,9	54,9	0,8 (0,4–1,3)	
	C/C	30,9	19,8	1,8 (0,9–3,6)	
<i>AGTRI</i> rs5186	A/A	51,6	41,7	1,0	0,008
	A/C	35,5	53,5	0,5 (0,3–1,0)	
	C/C	12,9	4,8	3,2 (0,9–11,7)	

Таблица 8. Ассоциация аллельных комбинаций локусов rs2074192, rs2285666 и rs699 с тяжестью течения коронавирусной инфекции

Table 8. Association of allelic combinations of rs2074192, rs2285666 and rs699 loci with the severity of coronavirus infection

Аллельная комбинация	Частота выявления, %			OR (95 % CI)	<i>p</i>
	Общая	1-я группа	2-я группа		
G-G-C	19,9	21,3	18,7	1,0	–
A-G-T	18,5	21,6	17,4	0,9 (0,5–1,7)	0,8
G-G-T	17,1	10,8	24,9	0,4 (0,2–0,8)	0,018
A-G-C	16,5	14,6	15,7	0,7 (0,3–1,4)	0,26
G-A-C	11,6	11,4	9,6	0,9 (0,4–1,8)	0,7
G-A-T	9,5	10,2	8,9	0,9 (0,4–2,0)	0,75
A-A-C	4,5	7,2	3,5	4,2 (1,1–9,4)	<0,0001
A-A-T	2,4	2,9	1,3	0,9 (0,9–1,9)	0,84

Исследование по одному из вариантов гена *LZTFL1* в популяции Великобритании установило ассоциацию риска смерти от COVID-19 с расой пациента. Так, риск летального исхода у пациентов из Южной Азии был в 4 раза выше, чем у пациентов европеоидной расы [15, 16].

В последующих исследованиях для другого варианта гена *LZTFL1* (rs11385942) установлена значимая ассоциация с развитием дыхательной недостаточности при COVID-19. Так, частота G-аллеля по этому маркеру была значимо выше у пациентов, которым выполнялась ИВЛ. При этом носительство генотипа G/G ассоциировалось с более молодым средним возрастом пациентов, которым выполнялась ИВЛ, по сравнению с носителями генотипа A/A. Установлено, что в Т-лимфоцитах белок LZTFL1 участвует в иммунологическом синапсе с антигенпрезентирующими клетками. Для маркера rs10490770 на разных популяциях показано, что он ассоциирован с тяжелым клиническим течением COVID-19 (с госпитализацией) [19].

В табл. 9 представлены результаты анализа ассоциации варианта гена *LZTFL1* rs10490770 с тяжестью течения коронавирусной инфекции.

Результаты, представленные в табл. 10, свидетельствуют о том, что полиморфный вариант *LZTFL1* rs10490770 статистически значимо ассоциирован с тяжестью течения коронавирусной инфекции. Так, показано, что носителей генотипа T/C в 2 раза больше среди пациентов с тяжелой формой течения заболевания. Среди носителей гетерозиготного генотипа T/C риск тяжелого течения заболевания многократно возрастает (коэффициент отношения шансов OR = 2,8; 95 % CI 1,5–5,2; *p* = 0,005).

Следует отметить, что не установлено достоверной ассоциации для носителей гомозиготного генотипа C/C. Это может быть обусловлено его низкой частотой встречаемости в популяции. В связи с тем, что частота минорного генотипа в исследуемой когорте составила менее 10 %, проведен анализ с использованием рецессивной модели наследования (табл. 10).

Таблица 9. Распределение частот генотипов по варианту *LZTFL1* rs10490770 у пациентов с коронавирусной инфекциейTable 9. Distribution of genotype frequencies of the *LZTFL1* rs10490770 variant among patients with coronavirus infection

Полиморфный вариант	Генотип	1-я группа (n = 99)	2-я группа (n = 107)	OR (95 % CI)	p
<i>LZTFL1</i> rs10490770	T/T	59,4	79,0	1,00	0,0046
	T/C	39,6	19,1	2,8 (1,5–5,2)	
	C/C	1,0	1,9	0,7 (0,1–7,8)	

Таблица 10. Распределение частот генотипов по варианту *LZTFL1* rs10490770 у пациентов с коронавирусной инфекцией (рецессивная модель наследования)Table 10. Distribution of genotype frequencies of the *LZTFL1* rs10490770 variant among patients with coronavirus infection (recessive model of inheritance)

Полиморфный вариант	Генотип	1-я группа (n = 99)	2-я группа (n = 107)	OR (95 % CI)	p
<i>LZTFL1</i> rs10490770	T/T	59,4	79,0	1,00	0,0021
	T/C + C/C	40,6	21,0	2,6 (1,4–4,8)	

Таким образом, по результатам анализа ассоциации варианта *LZTFL1* rs10490770 с тяжестью течения коронавирусной инфекции установлена статистически значимая ассоциация с использованием рецессивной модели наследования, что позволило установить повышенный риск тяжелого течения заболевания у носителей гетерозиготного генотипа T/C и гомозиготного C/C (OR = 2,6, p = 0,0021).

Аналогичная ассоциация выявлена в международном исследовании в когорте, состоящей из 13 424 пациентов с COVID-19 [20]. Так, селективный пространственный транскриптомный анализ биоптатов легких пациентов с COVID-19 показал наличие сигналов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом путем вирусного ответа, в регуляции которого участвует *LZTFL1*.

Заключение. Локусы генов, кодирующих ренин-ангиотензиновую систему, – *ACE2* rs2074192 и rs2285666, *AGTR1* rs5186, и гена *LZTFL1* rs10490770, а также аллельные комбинации между локусами *ACE2* rs2074192, rs2285666 и *AGT* rs699 являются информативными маркерами для прогнозирования тяжести течения COVID-19. Установлены генетические маркеры, ассоциированные с тяжелым течением COVID-19 в белорусской популяции пациентов: комбинация A-A локусов *ACE2* rs2074192 и rs2285666; носительство гетерозиготного генотипа *LZTFL1* rs10490770 T/C; аллельная комбинация A-A-C между тремя локусами: *ACE2* rs2074192, *ACE2* rs2285666 и *AGT* rs699 соответственно. Установлены генетические маркеры легкого/среднетяжелого течения COVID-19: носительство гетерозиготного варианта *AGTR1* rs5186 A/C; носительство аллельной комбинации G-G-T по локусам *ACE2* rs2074192, *ACE2* rs2285666 и *AGT* rs699 ассоциировалось со снижением риска тяжелого течения COVID-19.

Внедрение методики оценки предрасположенности к тяжелому клиническому проявлению коронавирусной инфекции в практику здравоохранения позволит сформировать группы риска таких пациентов, повысить эффективность их лечения и профилактики инфицирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект № M21КОВИД-036 от 01.02.2021 г.).

Acknowledgements. The work was carried out with the support of the BRFFR (project no. M21COVID-036 dated 01.02.2021).

Список использованных источников

1. Коростовцева, Л. С. COVID-19: каковы риски пациентов с артериальной гипертензией? / Л. С. Коростовцева, О. П. Ротарь, А. О. Конради // Артериал. гипертензия. – 2020. – Т. 26, № 2. – С. 124–132.
2. Devaux, C. A. An update on angiotensin-converting enzyme 2 structure/functions, polymorphism, and duplicitous nature in the pathophysiology of coronavirus disease 2019: Implications for vascular and coagulation disease associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection / C. A. Devaux, L. Camoin-Jau // Front. Microbiol. – 2022. – Vol. 13. – Art. 1042200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1042200>
3. Елькина, А. Ю. Полиморфные варианты генов ангиотензинпревращающего фермента, ангиотензиногена, гена рецептора 1 типа к ангиотензину-II как генетические предикторы развития артериальной гипертензии / А. Ю. Елькина, Н. С. Акимова, Ю. Г. Шварц // Рос. кардиол. журн. – 2021. – Т. 26, № S1. – С. 35–40.

4. Angiotensin-converting enzymes (ACE, ACE2) gene variants and COVID-19 outcome / J. Gómez [et al.] // *Gene*. – 2020. – Vol. 762. – Art. 145102. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145102>
5. ACE I/D polymorphism in Czech first-wave SARS-CoV-2-positive survivors / J. A. Hubacek [et al.] // *Clin. Chim. Acta*. – 2021. – Vol. 519. – P. 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.04.024>
6. Шишиморов, И. Н. Генетические предикторы тяжести течения и эффективности фармакотерапии COVID-19 / И. Н. Шишиморов, О. В. Магницкая, Ю. В. Пономарева // *Фармация и фармакология*. – 2021. – Т. 9, № 3. – С. 174–184.
7. Роль ренин-ангиотензиновой системы и ангиотензинпревращающего фермента 2 типа в развитии и течении вирусной инфекции COVID-19 у пациентов с сахарным диабетом / О. К. Викулова [и др.] // *Сахар. диабет*. – 2020. – Т. 23, № 3. – С. 242–249.
8. Genome-wide analysis provides genetic evidence that ACE2 influences COVID-19 risk and yields risk scores associated with severe disease / J. E. Horowitz [et al.] // *Nat. Genet.* – 2022. – Vol. 54, N 4. – P. 382–392. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-01006-7>
9. The relationship between angiotensinogen gene polymorphisms and essential hypertension in a Northern Han Chinese population / H. Li [et al.] // *Angiology*. – 2014. – Vol. 65, N 7. – P. 614–619. <https://doi.org/10.1177/0003319713491309>
10. Linkage of blood pressure, obesity and diabetes mellitus with angiotensinogen gene (AGT 704T>C/rs699) polymorphism in hypertensive patients / Y. Repchuk [et al.] // *Bratisl. Lek. Listy*. – 2021. – Vol. 122, N 10. – P. 715–720. https://doi.org/10.4149/BLL_2021_114
11. Association between angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin-II receptor 1 (AGTR1) polymorphisms and COVID-19 infection in the southeast of Iran: a preliminary case-control study / H. R. Kouhpayeh [et al.] // *Transl. Med. Commun.* – 2021. – Vol. 6, N 1. – Art. 26. <https://doi.org/10.1186/s41231-021-00106-0>
12. Angiotensin system polymorphisms' in SARS-CoV-2 positive patients: Assessment between symptomatic and asymptomatic patients: A pilot study / C. Cafiero [et al.] // *Pharmgenomics Pers. Med.* – 2021. – Vol. 27, N 14. – P. 621–629. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S303666>
13. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension / A. Bonnardeaux [et al.] // *Hypertension*. – 1994. – Vol. 24, N 1. – P. 63–69. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.24.1.63>
14. Allele C (rs5186) of at1r is associated with the severity of COVID-19 in the Ukrainian population / O. Izmailova [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* – 2022. – Vol. 98. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105227>
15. Геноеография в России и мире snp-маркеров гена lztfl1, ассоциированных с тяжелым течением COVID-19 / Е. В. Балаховская [и др.] // *Вестн. Рос. гос. мед. ун-та*. – 2022. – № 5. – С. 31–40. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2022.047>
16. Василевский, И. В. Генетические факторы человека, связанные с восприимчивостью к инфекции SARS-CoV-2 и тяжестью заболевания COVID-19 / И. В. Василевский // *Здравоохранение*. – 2022. – № 4. – С. 20–30.
17. Severity of coronavirus disease 19: Profile of inflammatory markers and ACE (rs4646994) and ACE2 (rs2285666) gene polymorphisms in Iraqi patients / Z. S. Mahmood [et al.] // *Meta Gene*. – 2022. – Vol. 31. – Art. 101014. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2022.101014>
18. Strong association of angiotensin converting enzyme-2 gene insertion/deletion polymorphism with susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, coronary artery disease and COVID-19 disease mortality / M. M. Mir [et al.] // *J. Pers. Med.* – 2021. – Vol. 11, N 11. – Art. 1098. <https://doi.org/10.3390/jpm11111098>
19. Mapping the human genetic architecture of COVID-19 / COVID-19 host genetics initiative // *Nature*. – 2021. – Vol. 600, N 7889. – P. 472–477. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03767-x>
20. Age-dependent impact of the major common genetic risk factor for COVID-19 on severity and mortality [Electronic resource] / T. Nakanishi [et al.] // *medRxiv*. – 2021. – Mode of access: <https://doi.org/10.1101/2021.03.07.21252875>. – Date of access: 10.10.2024.

References

1. Korostovtseva L. S., Rotar' O. P., Konradi A. O. COVID 19: What are the risks of patients with hypertension? *Arterial'naya gipertenziya* [Arterial hypertension], 2020, vol. 26, no. 2, pp. 124–132 (in Russian).
2. Devaux C. A., Camoin-Jau L. An update on angiotensin-converting enzyme 2 structure/functions, polymorphism, and duplicitous nature in the pathophysiology of coronavirus disease 2019: Implications. for vascular and coagulation disease associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Frontiers in Microbiology*, 2022, vol. 13, art. 1042200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1042200>
3. El'kina A. Yu., Akimova N. S., Shvarts Yu. G. Polymorphism of ACE, AGT, AGTR1 genes as genetic predictors of hypertension. *Rossiiskii kardiologicheskii zhurnal* [Russian cardiological journal], 2021, vol. 26, no. S1, pp. 35–40 (in Russian).
4. Gómez J., Albaiceta G. M., García-Clemente M., López-Larrea C., Amado-Rodríguez L., Lopez-Alonso I. [et al.]. Angiotensin-converting enzymes (ACE, ACE2) gene variants and COVID-19 outcome. *Gene*, 2020, vol. 762, art. 145102. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145102>
5. Hubacek J. A., Dusek L., Majek O., Adamek V., Cervinkova T., Dlouha D., Adamkova V. ACE I/D polymorphism in Czech first-wave SARS-CoV-2-positive survivors. *Clinica Chimica Acta*, 2021, vol. 519, pp. 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.04.024>
6. Shishimorov I. N., Magnitskaya O. V., Ponomareva Yu. V. Genetic predictors of the severity of the course and effectiveness of COVID-19 pharmacotherapy. *Farmatsiya i farmakologiya* [Pharmacy and pharmacology], 2021, vol. 9, no. 3, pp. 174–184 (in Russian).
7. Vikulova O. K., Zuraeva Z. T., Nikankina L. V., Shestakova M. V. The role of renin-angiotensin system and. *Sakharnyi diabet* [Diabetes mellitus], 2020, vol. 23, no. 3, pp. 242–249 (in Russian).
8. Horowitz J. E., Kosmicki J. A., Damask A., Sharma D., Roberts G. H. L., Justice A. E. [et al.]. Genome-wide analysis provides genetic evidence that ACE2 influences COVID-19 risk and yields risk scores associated with severe disease. *Nature Genetics*, 2022, vol. 54, no. 4, pp. 382–392. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-01006-7>

9. Li Hdu Zh., Zhang L., Wu T., Deng Zh., Li J., Cong M., Liu J., Qiu Ch. Angiology. The relationship between angiotensinogen gene polymorphisms and essential hypertension in a Northern Han Chinese population. *Angiology*, 2014, vol. 65, no. 7, pp. 614–619. <https://doi.org/10.1177/0003319713491309>
10. Repchuk Y., Sydoruchuk L. P., Sydoruchuk A. R., Fedonyuk L. Y., Kamyshnyi O., Korovenkova O. [et al.]. Linkage of blood pressure, obesity and diabetes mellitus with angiotensinogen gene (AGT 704T>C/rs699) polymorphism in hypertensive patients. *Bratislavské lekárske listy*, 2021, vol. 122, no. 10, pp. 715–720. https://doi.org/10.4149/BLL_2021_114
11. Kouhpayeh H. R., Tabasi F., Dehvari M., Naderi M., Bahari Gh., Khalili T., Clark C., Ghavami S., Taheri M. Association between angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin-II receptor 1 (AGTR1) polymorphisms and COVID-19 infection in the southeast of Iran: a preliminary case-control study. *Translational Medicine Communications*, 2021, vol. 6, no. 1, art. 26. <https://doi.org/10.1186/s41231-021-00106-0>
12. Cafiero C., Rosapepe F., Palmirotta R., Re A., Ottaiano M. P., Benincasa G. [et al.]. Angiotensin system polymorphisms in SARS-CoV-2 positive patients: Assessment between symptomatic and asymptomatic patients: A pilot study. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 2021, vol. 27, no. 14, pp. 621–629. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S303666>
13. Bonnardeaux A., Davies E., Jeunemaitre X., Féry I., Charru A., Clauser E., Tiret L., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*, 1994, vol. 24, no. 1, pp. 63–69. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.24.1.63>
14. Izmailova O., Shlykova O., Vatsenko A., Ivashchenko D., Dudchenko M., Koval T., Kaidashev I. Allele C (rs5186) of *at1r* is associated with the severity of COVID-19 in the Ukrainian population. *Infection, Genetics and Evolution*, 2022, vol. 98. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105227>
15. Balanovskaya E. V., Gorin I. O., Petrushenko V. S., Chernevskiy D. K., Koshe S. M., Temirbulatov I. I., Pylev V. Yu., Agdzhoyan A. T. Geographic distribution of the LZTFL1 SNP markers associated with severe COVID-19 in Russia and world-wide. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Bulletin of Russian State Medical University], 2022, no. 5, pp. 30–39 (in Russian). <https://doi.org/10.24075/brsmu.2022.047>
16. Vasilevskii I. V. Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and severity of COVID-19 disease. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2022, no. 4, pp. 20–30 (in Russian).
17. Mahmood Z. S., Fadhil H. Y., Abdul Hussein T. A., Ad'hiah A. H. Severity of coronavirus disease 19: Profile of inflammatory markers and ACE (rs4646994) and ACE2 (rs2285666) gene polymorphisms in Iraqi patients. *Meta Gene*, 2022, vol. 31, art. 101014. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2022.101014>
18. Mir M. M., Mir R., Alghamdi M. A. A., Alsayed B. A., Wani J. I., Alharthi M. H., AL-Shahrani A. M. Strong association of angiotensin converting enzyme-2 gene insertion/deletion polymorphism with susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, coronary artery disease and COVID-19 disease mortality. *Journal of Personalized Medicine*, 2021, vol. 11, art. 1098. <https://doi.org/10.3390/jpm11111098>
19. COVID-19 host genetics initiative. Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature*, 2021, vol. 600, no. 7889, pp. 472–477. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03767-x>
20. Nakanishi T., Pigazzini S., Degenhardt F., Cordioli M., Butler-Laporte G., Maya-Miles D. [et al.]. Age-dependent impact of the major common genetic risk factor for COVID-19 on severity and mortality. *medRxiv*, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1101/2021.03.07.21252875> (accessed 10.10.2024).

Информация об авторах

Матиевская Наталья Васильевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-8492-6377>. E-mail: natamati@mail.ru

Кузнецова Екатерина Владимировна – ст. преподаватель. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: kat.kuzniatsova@gmail.com

Морозик Павел Михайлович – канд. биол. наук, доцент, заместитель директора по научной работе. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-5973-7870>. E-mail: P.Marozik@igc.by

Козловский Валерий Иванович – доцент, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-8153-7963>. E-mail: vkz45@yahoo.com

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

Information about the authors

Natalia V. Matsiyenskaya – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-8492-6377>. E-mail: natamati@mail.ru

Katsiaryna U. Kuzniatsova – Senior Lecturer. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: kat.kuzniatsova@gmail.com

Pavel M. Marozik – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Deputy Director. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-5973-7870>. E-mail: P.Marozik@igc.by

Valery I. Kozlovski – Associate Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-8153-7963>. E-mail: vkz45@yahoo.com

Volha U. Harchakova – Master of Med. Sci., Senior Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: daniil_go@inbox.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 618.177-089.888.11:577.175.324

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-305-315>

Поступила в редакцию 16.09.2024

Received 16.09.2024

С. В. Жуковская, Л. Ф. Можейко

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ПРИ БЕСПЛОДИИ У ЖЕНЩИН С ЭУТИРЕОИДНЫМ СТАТУСОМ

Аннотация. Вопрос о влиянии тиреотропного гормона (ТТГ) на вероятность наступления беременности в современной научной литературе является дискуссионным, поскольку опубликованные на протяжении последних нескольких лет результаты исследований подвергают сомнению общепринятое мнение о том, что при планировании беременности уровень ТТГ должен быть снижен до целевых значений, не превышающих 2,5 мМЕ/л.

Цель исследования – изучить влияние повышения у женщин концентрации ТТГ в пределах 2,5–4,0 мМЕ/л на исходы программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), проанализировав параметры контролируемой овариальной стимуляции (КОС) и эмбриологические показатели ее эффективности, а также на частоту наступления беременности и репродуктивных потерь.

Работа проведена на базе учреждения здравоохранения МЧУП «Центр репродуктивной медицины». В исследовании было включено 195 супружеских пар, которым проводили ЭКО в связи с бесплодием. Сформированы две группы: 1-ю группу составили 94 женщины, у которых уровень ТТГ составлял 2,5–4,0 мМЕ/л, 2-ю группу – 101 женщина, у которой данный показатель до начала овариальной стимуляции не превышал 2,5 мМЕ/л. Показано, что у женщин с концентрацией ТТГ 2,5–4,0 мМЕ/л при условии эутиреоидного статуса эмбриологические параметры эффективности КОС (качество роста фолликулов, созревания яйцеклеток, процент фертилизации и образования blastocyst) в обеих группах были сравнимы. Установлено, что эффективность программ ЭКО не зависит от прекоцепционного уровня ТТГ, если данный показатель находится в диапазоне 2,5–4,0 мМЕ/л: отмечена сопоставимая частота наступления беременности (60,64 и 51,49 %; $p = 0,254$), частота самопроизвольного прерывания беременности в первом триместре (15,79 и 9,62 %; $p = 0,500$), частота поздних самопроизвольных выкидышей в сроке гестации 12–22 недели (3,51 и 11,54 %; $p = 0,709$).

Ключевые слова: бесплодие, вспомогательные репродуктивные технологии, экстракорпоральное оплодотворение, тиреотропный гормон

Для цитирования: Жуковская, С. В. Эффективность экстракорпорального оплодотворения при бесплодии у женщин с эутиреоидным статусом / С. В. Жуковская, Л. Ф. Можейко // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 4. – С. 305–315. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-305-315>

Svetlana V. Zhukovskaya, Lyudmila F. Mozhejko

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

EFFECTIVENESS OF *IN VITRO* FERTILIZATION FOR INFERTILITY IN WOMEN WITH EUTHYROID STATUS

Abstract. The influence of thyroid hormone (TSH) on the probability of pregnancy is a controversial issue in modern scientific literature, since impressive scientific data has been published lately questioning previously undoubted fact that preconception levels of TSH must be decreased to target values not exceeding 2.5 mIU/l.

The aim of the research was to investigate the influence of elevation of TSH in the range of 2.5–4.0 mIU/l in women on the outcomes of in-vitro fertilization (IVF) procedures by analyzing the parameters of controlled ovarian stimulation (COS) and embryological indicators of its efficacy, as well as the percentage of pregnancy and reproductive losses.

The work was based in “Centre for Reproductive Medicine”. The study included 195 married couples that underwent IVF due to infertility. Two groups were formed: Group 1 consisted of 94 women with pre-IVF TSH ranging between 2.5–4.2 mIU/l, while Group 2 included 101 women with the initial level of TSH before the beginning of ovarian stimulation less than 2.5 mIU/l.

It was established that in women with TSH ranging between 2.5–4.2 mIU/l with normal levels of free thyroxine, embryological parameters of COS efficiency showed comparable results of follicle growth, oocyte maturation, percentage of blastocyst formation in both groups. The efficiency of *in vitro* fertilization was found to be independent of the preconception TSH level if this index was in the range of 2.5–4.2 mIU/l: comparable incidence of pregnancy (60.64 and 51.49 %; $p = 0.254$), incidence of spontaneous abortion in the 1st trimester (15.79 and 9.62 %; $p = 0.500$), incidence of late spontaneous miscarriage at gestational age 12–22 weeks (3.51 and 11.54 %; $p = 0.709$ were observed).

Keywords: infertility, assisted reproductive technologies, *in vitro* fertilization, thyroid stimulating hormone

For citation: Zhukovskaya S. V., Mozhejko L. F. Effectiveness of *in vitro* fertilization for infertility in women with euthyroid status. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 4, pp. 304–315 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-304-315>

Введение. Тиреотропный гормон (ТТГ) рассматривается как один из важнейших гормонов, ассоциированных с возникновением репродуктивных нарушений, таких как овуляторная дисфункция, бесплодие, репродуктивные потери и гестационные осложнения [1]. Установлено влияние ТТГ на процессы фолликулогенеза, метаболизм эстрогенов и андрогенов, а также на параметры менструального цикла и рецептивность эндометрия [2–4]. Общепринятым считается определенный «целевой уровень» ТТГ (не более 2,5 мМЕ/л), к которому рекомендовано стремиться в рамках прегравидарной подготовки с целью снижения риска неблагоприятных исходов и повышения вероятности наступления беременности, в том числе с использованием программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [5]. Однако в современной научной литературе приводятся данные о том, что достижение концентрации ТТГ <2,5 мМЕ/л в ходе прегравидарной подготовки не является необходимым. Так, в статье Y. Zhong с соавт. (2023) заявлено, что прекоцепционный уровень ТТГ $\geq 2,5$ мМЕ/л не продемонстрировал достоверной корреляции с таким показателем, как “time-to-pregnancy”, т. е. «время до наступления беременности», в здоровой популяции. В ходе исследования, включавшего 1401 супружескую пару, в которых были женщины с уровнем ТТГ до зачатия в пределах 0,50–5,59 мМЕ/л, установлено, что 1 082 (77,2 %) женщины забеременели в течение 12 мес. При проведении сравнительного анализа выявлено, что доля женщин, забеременевших с «высоким нормальным» уровнем ТТГ (2,50–5,59 мМЕ/л), была сопоставима с таковой в группе женщин с рутинно рекомендуемым уровнем ТТГ (0,50–2,49 мМЕ/л) (79,0 % против 78,1 %), при этом статистически значимых различий не наблюдалось [6].

Учитывая стабильный рост распространенности бесплодия и широкое применение ВРТ в мировом масштабе, актуальным является вопрос о роли ТТГ в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и о необходимости медикаментозной коррекции данного показателя, находящегося в пределах 2,5–4,0 мМЕ/л у женщин с показателями концентрации свободного тироксина (свТ4) в пределах референсных норм. Одной из первых научных публикаций, посвященных этой проблеме, была работа K. Michalakis с соавт. (2011), в результате которой было установлено, что в исследуемой группе, включавшей 1 231 женщину, обратившуюся для проведения программы ЭКО, распространенность умеренно повышенного уровня ТТГ (2,5–4,0 мМЕ/л) составила 23 %, при этом повышенный уровень ТТГ до зачатия был ассоциирован со снижением овариального резерва, но не с неблагоприятными исходами ВРТ или беременности [7].

В более современной статье V. D. Assunção с соавт. (2022) опубликованы схожие результаты: установлено, что колебания уровня ТТГ в пределах нормы не связаны с частотой наступления беременности и родов у женщин без аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, прошедших процедуру ЭКО. В ретроспективном когортном исследовании приняли участие 256 женщин, прошедших процедуру ЭКО, при этом были сформированы две группы: женщины, у которых ТТГ находился в пределах 0,5–2,49 мМЕ/л, и женщины, у которых данный показатель составлял 2,5–4,5 мМЕ/л. Выявлено, что возраст, индекс массы тела (ИМТ), уровень свТ4, гормональный профиль и результаты ЭКО не имели статистически достоверных различий между группами, как и гестационные исходы [8]. Авторами проведен также крупный систематический обзор с мета-анализом, который включал 17 исследований с 2006 по 2022 г. – суммарно 13 247 женщин, прошедших процедуру ЭКО. При сравнении частоты клинических беременностей между группами по уровню ТТГ не выявлено существенной разницы (ОР – 0,93; 95 % ДИ – 0,80–1,08), количество родов также не имело существенных различий между группами [8].

В 2021 г. было опубликовано руководство Европейской ассоциации щитовидной железы (European Thyroid Association), определяющее особенности проведения ВРТ: не рекомендовано проведение гормональной терапии, направленной на снижение ТТГ у женщин с ТТГ 2,5–4,0 мМЕ/л и нормальными показателями свТ4 даже при сочетании с повышенной концентрацией антител к тиреопероксидазе (АТ-ТПО). Решение о проведении гормональной терапии должно приниматься

с учетом дополнительных факторов, таких как снижение овариального резерва, привычное невынашивание, возраст более 35 лет и др. [9].

Таким образом, очевидна актуальность и целесообразность проведения собственных исследований с целью более детального и глубокого изучения взаимосвязи преконцепционного уровня ТТГ у женщин в программах ЭКО с целью оптимизации тактики преодоления бесплодия.

Цель исследования – изучить влияние субклинического повышения концентрации ТТГ (2,5–4,0 мМЕ/л) у женщин на исходы программ экстракорпорального оплодотворения, проанализировать параметры контролируемой овариальной стимуляции и эмбриологические показатели ее эффективности, а также частоту наступления беременности и репродуктивных потерь.

Задачи исследования:

оценить особенности менструальной функции у женщин в исследуемых группах, сравнивая возраст менархе, длительность менструации, длительность менструального цикла, а также нарушения менструальной функции;

изучить параметры контролируемой овариальной стимуляции и эмбриологические показатели ее эффективности;

проанализировать влияние субклинического повышения концентрации ТТГ (2,5–4,0 мМЕ/л) у женщин на исходы программ ЭКО.

Объекты и методы исследования. Проведено клинико-лабораторное обследование 195 женщин с бесплодием и эутиреоидным статусом в возрасте 18–49 лет, обратившихся в МЧУП «Центр репродуктивной медицины» (г. Минск, Республика Беларусь) по поводу бесплодия, с целью проведения программ ЭКО.

Определение медицинских показаний, выявление медицинских противопоказаний к применению ВРТ, медицинский осмотр пациентов проводили в соответствии с постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 24.12.2019 г. № 124 «О вопросах применения вспомогательных репродуктивных технологий» [10].

Критерии включения в исследование: возраст 18–49 лет, бесплодие и отсутствие эффекта от проводимого лечения в течение 1 года и более, письменное информированное согласие на участие в исследовании, эутиреоидный статус, т. е. концентрация свТ4 в пределах референсных норм.

Критерии исключения из исследования: наличие противопоказаний к проведению ВРТ в соответствии с постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 24.12.2019 г. № 124 «О вопросах применения вспомогательных репродуктивных технологий» [10]; тяжелые формы мужского бесплодия (азооспермия, криптозооспермия, выраженная патоспермия); аномалии кариотипа (транслокации, делеции, инверсии и др.); маточная форма бесплодия (врожденные аномалии развития, патология эндометрия, наличие миоматозных узлов субмукозной и интрамурально-субмукозной локализации любого размера, наличие миоматозных узлов любой иной локализации более 4 см в диаметре); эндометриоз (стадия III–IV); иммунологический фактор бесплодия (антифосфолипидный синдром, наличие антител к аннексину-V, антиспермальных и антиовариальных антител в сыворотке крови); идиопатическое бесплодие.

Обследование женщин включало в себя следующее: на 2–5-й дни менструального цикла проводили забор венозной крови для определения содержания фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, ТТГ, пролактина (ПРЛ). До начала контролируемой овариальной стимуляции у всех обследуемых женщин в сыворотке крови определяли уровни антимюллерова гормона (АМГ), АТ-ТПО, свободной фракции тироксина. Определение гормонов в сыворотке крови проводили в клинико-диагностической лаборатории МЧУП «Центр репродуктивной медицины», имеющей сертификат системы менеджмента качества ISO-9001. Концентрацию гормонов в сыворотке крови определяли на иммуноферментном анализаторе Thermo Fisher Scientific, используя иммуноферментные тест-системы (ELISA) производства компании DRG Diagnostics (Германия).

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза выполняли на аппарате Aloka Pro-sound Alpha 6 (Япония) с использованием трансвагинального датчика с частотой 7 МГц.

Сформировано две группы в зависимости от концентрации ТТГ в сыворотке крови: в 1-ю группу вошли 94 женщины, у которых данный показатель составил 2,5–4,2 мМЕ/л, во 2-ю группу – 101 женщина с исходным уровнем ТТГ до начала овариальной стимуляции не более 2,5 мМЕ/л.

Контролируемая овариальная стимуляция проводилась по следующей схеме: с 3-го дня менструального цикла ежедневно вводили фоллитропин альфа в индивидуально подбираемой дозировке, а при достижении фолликулами диаметра 14 мм дополнительно назначали антагонист гонадотропин-рилизинг гормона (цетрореликс 0,25 мг/сут) до дня введения триггера финального дозревания ооцитов (ФДО), в качестве которого был использован хориогонадотропин альфа 6 500 МЕ. Триггер ФДО в обеих группах назначали при достижении фолликулами диаметра более 17 мм. Получение ооцитов из фолликулярной жидкости осуществлялось путем трансвагинальной пункции фолликулов под контролем УЗИ с применением внутривенной анестезии через 34–36 ч после введения триггера ФДО. Далее *in vitro* проводили оплодотворение и культивацию эмбрионов до стадии бластоцисты. На эмбриологическом этапе зрелые ооциты маркировали и помещали в специальную среду для культивирования, оценивали их качество и степень зрелости. Преинкубацию, оплодотворение ооцитов, а также культивирование эмбрионов осуществляли в средах для культивирования фирмы ORIGIO (Дания). Перенос эмбрионов (ПЭ) в полость матки проводили на 5-е сутки культивирования с помощью внутриматочного катетера Wallace. Оставшиеся бластоцисты высокого качества криоконсервировали методом витрификации с целью их использования в последующих программах ВРТ. На 5-е сутки после оплодотворения осуществляли ПЭ в полость матки под контролем УЗИ. Для посттрансферной гестагенной поддержки использовали микронизированный прогестерон (сустен 600 мг/сут, вагинально). Беременность диагностировали на 12–14-е сутки после ПЭ путем определения содержания β -субъединицы хорионического гонадотропина человека в сыворотке крови, а также на 21-е сутки после ПЭ по данным трансвагинального УЗИ органов малого таза.

Для статистической обработки полученных данных использовали персональную ЭВМ со следующим программным обеспечением: MS Office Excel 2013, лицензионная версия DataTab Software, лицензионный пакет программы MedCalc.

Перед проведением сравнительного анализа количественных данных в исследуемых группах определяли вид распределения данных (проверку на соответствие закону распределения проводили с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка с поправкой Лилиефорса). Поскольку при использовании критерия нормальности Шапиро–Уилка $p < 0,05$ (принятая критическая величина), распределение всех переменных считали отличным от нормального. Количественные данные были сгруппированы в таблицы и представлены в виде медианы (Me) и квартильного размаха (LQ – нижняя квартиль, UQ – верхняя квартиль). Для сравнения количественных данных в двух исследуемых группах использовали тест Манна–Уитни с поправкой значений Бонферрони; критерий Манна–Уитни считали значимым при $p < 0,05$. При анализе двух качественных дихотомических признаков и оценке статистической значимости использовали критерий хи-квадрат с поправкой Йейтса, при количестве исследований менее 5 – поправку Фишера (χ^2). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В первую очередь проводили сравнительную оценку таких показателей, как возраст, рост и масса тела с последующим расчетом ИМТ (табл. 1).

Таблица 1. Возраст и ИМТ у пациентов исследуемых групп, Me [LQ; UQ]

Table 1. Age and BMI in the patients of studied groups, Me [LQ; UQ]

Показатель	Группа 1 (n = 94)	Группа 2 (n = 101)	Статистическая значимость различий	
			<i>p</i>	<i>U</i>
Возраст, лет	32 [30; 34]	32 [29; 34]	0,182	4220,50
ИМТ, кг/м ²	21,6 [20,4; 24,7]	21,8 [20,5; 25,2]	0,918	4706,00

Как видно из табл. 1, статистически значимые межгрупповые различия по оцениваемым показателям отсутствовали. Так, медиана возраста в 1-й группе составила 32 [30; 34] года, в то время как во 2-й группе – 32 [29; 34] года ($p = 0,182$), при этом среди пациентов 1-й группы 20,2 % женщин относились к позднему репродуктивному периоду, т. е. их возраст составлял 35 лет и более, а во 2-й группе доля женщин позднего репродуктивного периода составила 7,9 % ($\chi^2 = 6,167$; $p = 0,014$). В 1-й группе у 21 (22,3 %) женщины отмечалась избыточная масса тела с ИМТ

25,0–29,9 кг/м², в то время как среди пациентов 2-й группы избыток массы тела присутствовал у 26 (25,7 %) женщин ($\chi^2 = 0,308$; $p = 0,579$). Отдельно следует отметить, что пациенты с дефицитом массы тела (ИМТ < 18,5 кг/м²) и с ожирением (ИМТ > 30,0 кг/м²) вступали в протокол ЭКО после консультации эндокринолога, нормализации данного показателя и достижения целевого интервала ИМТ (18,5–29,9 кг/м²).

В ходе исследования оценивали менструальную функцию у пациентов обеих групп, для чего были проанализированы следующие показатели: возраст менархе, длительность менструации, длительность менструального цикла, а также нарушения менструальной функции (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика менструальной функции у пациентов исследуемых групп, Me [LQ; UQ]

Table 2. Menstrual cycle characteristics in the patients of studied groups, Me [LQ; UQ]

Показатель	Группа 1 (n = 94)	Группа 2 (n = 101)	Статистическая значимость различий	
			p	U
Возраст менархе, лет	11 [11; 12]	12 [11; 13]	0,123	4138,00
Длительность менструации, дни	4 [3; 5]	4 [3; 6]	0,179	4217,00
Длительность менструального цикла, дни	29 [27; 30]	29 [27; 30]	0,566	4520,50

Таким образом, медиана возраста менархе у женщин 1-й группы составила 11 лет, во 2-й группе – 12 лет; медианы длительности менструального цикла и длительности менструации в 1-й группе составили 29 и 4 дня, во 2-й группе – 29 и 4 дня соответственно; статистически значимых различий по исследуемым параметрам в обеих группах не выявлено. Случаев преждевременного либо запоздалого полового развития в исследуемых группах не отмечалось. При более детальном анализе характера менструального цикла установлено, что нарушения его длительности при нормальной длительности 24–38 дней наблюдались у 12 (12,8 %) женщин 1-й группы и у 9 (8,9 %) пациентов 2-й группы ($\chi^2 = 0,753$; $p = 0,386$). Аномальные маточные кровотечения в анамнезе отмечались у 8 (8,6 %) и 11 (10,9 %) пациентов 1-й и 2-й групп соответственно ($\chi^2 = 0,261$; $p = 0,610$). Клинически значимая дисменорея в анамнезе, которая вызывала необходимость обследования и лечения, выявлена у 21 (22,3 %) женщины 1-й исследуемой группы и у 28 (27,7 %) пациентов 2-й группы ($\chi^2 = 0,750$; $p = 0,387$).

Далее был проведен детальный анализ структуры бесплодия: оценивали частоту встречаемости первичного и вторичного бесплодия у пациентов обеих групп, определяли причины бесплодия на основании результатов клиничко-лабораторного обследования супружеских пар. Так, первичное бесплодие у женщин 1-й и 2-й групп отмечалось у 56 (59,6 %) и 62 (61,4 %) пациентов соответственно ($\chi^2 = 0,067$; $p = 0,796$).

Согласно критериям исключения, в исследование не были включены пациенты с маточной формой бесплодия, с иммунологическим и идиопатическим бесплодием, а также супружеские пары с тяжелыми формами мужского бесплодия (азооспермия, выраженная патозооспермия, криптозооспермия), которые требовали бы дополнительных манипуляций, таких как тестикулярная биопсия и интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов. В то же время олигоастенотератозооспермия I–II степени не являлась критерием исключения из исследования. Нами не выявлено статистически значимых различий по причинам бесплодия между пациентами исследуемых групп (табл. 3).

Из данных, представленных в табл. 3, следует, что ведущая роль среди причин бесплодия в обеих исследуемых группах принадлежит трубно-перитонеальному фактору: 33 (35,1 %) и 33 (32,7 %) пациентов в 1-й и 2-й группах соответственно ($\chi^2 = 0,129$; $p = 0,720$). Следующим фактором, вносящим существенный вклад в структуру бесплодия, являлся мужской фактор, т. е. олигоастенотератозооспермия I–II степени, которая была диагностирована у мужчин в 28 (29,8 %) и 30 (29,8 %) случаях в 1-й и 2-й группах соответственно ($\chi^2 = 0,021$; $p = 0,990$). Эндокринный фактор бесплодия, представленный хронической ановуляцией, наблюдался у 10 (10,6 %) женщин в 1-й исследуемой группе и у 10 (9,9 %) пациентов во 2-й группе. Следует отметить, что у всех пациентов с хронической ановуляцией ранее предпринимались попытки стимуляции овуляции такими препаратами, как кломифена цитрат и/или летрозол, однако в связи с отсутствием эффекта от данной терапии было принято решение о проведении процедуры ЭКО.

Таблица 3. Причины бесплодия у пациентов исследуемых групп

Table 3. Infertility causes in the patients of studied groups

Фактор бесплодия	Группа 1 (n = 94)		Группа 2 (n = 101)		Статистическая значимость различий	
	Всего	%	Всего	%	$\chi^2_{1,2}$	$p_{1,2}$
Трубно-перитонеальный	33	35,1	33	32,7	0,129	0,720
Мужской	28	29,8	30	29,8	0,021	0,990
Эндокринный	10	10,6	10	9,9	0,029	0,866
Сочетанный (эндокринный + трубно-перитонеальный)	7	7,4	9	8,9	0,139	0,710
Комбинированный (мужской + женский)	16	17,1	19	18,7	0,106	0,745

При подготовке женщин к программам ЭКО до начала проведения контролируемой овариальной стимуляции нами исследовались уровни фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов, а также ПРЛ в сыворотке крови (табл. 4). Согласно полученным результатам, у пациентов обеих групп не обнаружено отклонений от нормативных значений основных гипофизарных гормонов, влияющих на менструальный цикл (ФСГ, ЛГ, ПРЛ).

Таблица 4. Уровни ФСГ, ЛГ и ПРЛ до начала контролируемой овариальной стимуляции, Me [LQ; UQ]

Table 4. FSH, LH and prolactin levels before initiation of controlled ovarian stimulation, Me [LQ; UQ]

Показатель	Группа 1 (n = 94)	Группа 2 (n = 101)	Статистическая значимость различий	
			p	U
ФСГ, мМЕ/мл	5,19 [3,83; 5,88]	5,12 [3,90; 5,86]	0,994	4743,50
ЛГ, мМЕ/мл	6,70 [4,75; 7,64]	5,6 [3,80; 8,42]	0,686	4587,00
ПРЛ, мМЕ/л	251,19 [191,09; 345,55]	287,92 [245,04; 426,50]	0,002	3526,00

Из приведенных в табл. 4 данных следует, что медиана содержания ФСГ в периферической крови у пациентов 1-й группы составила 5,19 мМЕ/мл, у женщин 2-й группы – 5,12 мМЕ/мл; статистически значимых межгрупповых различий не выявлено ($p = 0,994$). Концентрация ЛГ в сыворотке составила 6,7 мМЕ/мл у пациентов 1-й группы и 5,6 мМЕ/мл у пациентов 2-й группы, при этом достоверных различий также не выявлено ($p = 0,686$). Важным при анализе полученных результатов являлся тот факт, что уровень ПРЛ находился в пределах нормы у пациентов обеих исследуемых групп, что не требовало предварительной коррекции: медиана концентрации составила 251,19 и 287,92 мМЕ/л у женщин 1-й и 2-й групп соответственно, однако при этом выявлены статистически значимые межгрупповые различия согласно результатам теста Манна–Уитни ($p = 0,002$).

С целью оценки влияния тиреоидного статуса пациентов на эффективность и безопасность программ ЭКО нами проводилась сравнительная оценка концентрации ТТГ передней доли гипофиза, свТ4 и АТ-ТПО в сыворотке крови с целью изучения потенциального влияния так называемого «субклинического повышения ТТГ» на результативность процедуры ЭКО (табл. 5).

Учитывая тот факт, что изначально формирование групп проводилось на основании концентрации ТТГ в сыворотке крови, группы достоверно различались по данному показателю. Так, медиана ТТГ у женщин 1-й группы составила 3,45 мМЕ/л, в то время как у пациентов 2-й группы – 1,37 мМЕ/л ($p < 0,001$). Следует отметить, что в данное исследование (в соответствии с критериями включения) вошли женщины исключительно на фоне эутиреоидного состояния – медиана содержания свТ4 находилась в пределах допустимых значений в обеих группах и составляла 14,7 и 14,64 пмоль/л соответственно ($p = 0,56$). Медиана концентрации АТ-ТПО также находилась в пределах референсных значений в обеих группах и составляла 16,91 и 18,4 МЕ/мл в 1-й и 2-й группах соответственно, однако у некоторых пациентов в каждой группе значения АТ-ТПО превышали референсную норму (более 35 МЕ/мл): в 26 (27,7 %) и 24 (23,8 %) случаях в 1-й и 2-й группах соответственно ($\chi^2 = 0,388$; $p = 0,534$).

Таблица 5. Тиреодный статус обследуемых пациентов до начала КОС в программах ВРТ, Ме [LQ; UQ]

Table 5. Thyroid function in the studied groups before COS in IVF procedures, Me [LQ; UQ]

Показатель	Группа 1 (n = 94)	Группа 2 (n = 101)	Статистическая значимость различий	
			p	U
ТТГ, мМЕ/л	3,45 [3,2; 3,69]	1,37 [0,98; 1,83]	<0,001	
свТ4, пмоль/л	14,7 [13,42; 13,58]	14,64 [13,58; 16,43]	0,56	4517,00
АТ-ТПО, МЕ/мл	16,91 [5,44; 44,8]	18,4 [12,87; 31,21]	0,671	4579,00

Кроме того, тщательно изучали анамнез и оценивали состояние щитовидной железы у всех женщин исследуемых групп. В результате анализа полученных данных не было отмечено статистически значимых различий по структуре и частоте встречаемости заболеваний щитовидной железы (табл. 6).

Таблица 6. Патология щитовидной железы у пациентов исследуемых групп

Table 6. Thyroid pathology in the patients of studied groups

Фактор бесплодия	Группа 1 (n = 94)		Группа 2 (n = 101)		Статистическая значимость различий	
	Всего	%	Всего	%	$\chi^2_{1,2}$	$P_{1,2}$
Патология щитовидной железы	18	19,1	21	20,8	0,082	0,775
В том числе:						
аутоиммунный тиреоидит	2	2,1	3	3,2	0,07	0,795
гипотиреоз в анамнезе	6	6,4	7	6,9	0,52	0,473
узловая патология щитовидной железы	10	10,6	11	10,9	0,003	0,955

Анализ данных, приведенных в табл. 6, показал, что 18 (19,1 %) женщин 1-й группы и 21 (20,8 %) женщины 2-й группы имели какую-либо патологию щитовидной железы. Так, наиболее часто была диагностирована узловатая патология щитовидной железы (10,6 и 10,9 % пациентов в 1-й и 2-й группах соответственно).

В процессе подготовки к проведению ЭКО все пациенты с выявленными нарушениями эндокринного статуса были проконсультированы эндокринологом, и при необходимости им назначалось лечение, направленное на коррекцию выявленных эндокринных нарушений. Программы ЭКО проводились после коррекции эндокринных нарушений и получения заключения эндокринолога об отсутствии противопоказаний к процедуре ЭКО.

С целью изучения овариального резерва женщин, включенных в программы ЭКО, нами проводилось исследование концентрации АМГ в сыворотке крови всех пациентов в процессе обследования и подготовки к началу контролируемой овариальной стимуляции: медиана данного показателя в 1-й группе составила 3,42 [3,06; 4,35] нг/мл, во 2-й группе – 3,4 [3,1; 4,05] нг/мл, при этом статистически значимых межгрупповых различий не выявлено ($U = 4688,5$; $p = 0,883$). Кроме того, в 1-й группе низкий показатель АМГ (менее 1,0 нг/мл) отмечен у 4 (4,2 %) женщин, во 2-й группе – всего у 1 (0,99 %) пациента ($\chi^2 = 2,078$; $p = 0,15$).

С целью сонографической оценки овариального резерва у пациентов исследуемых групп нами проводился подсчет общего количества антральных фолликулов в двух яичниках до начала проведения контролируемой овариальной стимуляции: у пациентов 1-й группы данный показатель составил 11 [10; 12] фолликулов, у женщин 2-й группы – 10 [10; 12] фолликулов ($U = 4633,5$; $p = 0,774$), что свидетельствует об отсутствии статистически значимых межгрупповых различий.

Сопоставимые показатели овариального резерва в двух сравниваемых группах – концентрация АМГ и количество антральных фолликулов – дают основание для дальнейшей оценки и сравнительного анализа эффективности программы ЭКО у женщин данных групп, так как не являются системными конфаундерами, способными оказать независимое влияние на результаты ВРТ и, как следствие, на достоверность полученных результатов.

С целью изучения особенностей проведения программы ЭКО проведен сравнительный анализ основных параметров контролируемой овариальной стимуляции у женщин исследуемых групп, таких как длительность стимуляции гонадотропными лекарственными средствами и суммарная доза ФСГ (табл. 7).

Таблица 7. Параметры контролируемой овариальной стимуляции у пациентов исследуемых групп, Me [LQ; UQ]

Table 7. Parameters of controlled ovarian stimulation in the patients of studied groups, Me [LQ; UQ]

Показатель	Группа 1 (n = 94)	Группа 2 (n = 101)	Статистическая значимость различий	
			p	U
Суммарная доза ФСГ, МЕ	1575 [1125; 1800]	1350 [1125; 1800]	0,616	4549,00
Длительность стимуляции, сут	9 [8,25; 10]	9 [9; 10]	0,747	4619,50

Как видно из табл. 7, статистически значимые межгрупповые различия по оцениваемым показателям отсутствовали. Так, медиана суммарной дозы ФСГ составила 1575,0 МЕ в 1-й группе и 1350,0 МЕ во 2-й; длительность овариальной стимуляции в 1-й и 2-й группах – в среднем 9 сут.

Затем были изучены эмбриологические параметры, позволяющие оценить эффективность проведенной КОС у женщин, включенных в исследование (табл. 8).

Таблица 8. Эмбриологические показатели эффективности контролируемой овариальной стимуляции у пациентов исследуемых групп, Me [LQ; UQ]

Table 8. Embryologic parameters of the controlled ovarian stimulation efficiency in the patients of studied groups, Me [LQ; UQ]

Показатель	Группа 1 (n = 94)	Группа 2 (n = 101)	Статистическая значимость различий	
			p	U
Количество фолликулов в день трансвагинальной пункции	11,00 [10,00; 12,00]	11,00 [10,00; 12,00]	0,710	4600,00
Количество полученных ооцитов	11,00 [10,00; 12,00]	10,00 [10,00; 11,00]	0,290	4329,50
Количество blastocyst	5,00 [3,00; 6,00]	4,00 [4,00; 5,00]	0,505	4483,50

Согласно данным, представленным в табл. 8, медианы изучаемых показателей в 1-й группе были следующими: число фолликулов в день трансвагинальной пункции составило 11; получено 11 пригодных к оплодотворению ооцитов, успешная фертилизация и развитие до стадии blastocyst отмечены в 45,45 % случаев. Во 2-й группе медианы таковы: количество фолликулов – 11; 10 пригодных для оплодотворения ооцитов использованы для фертилизации *in vitro*, в результате чего 42,86 % ооцитов были успешно оплодотворены и впоследствии развились до стадии blastocyst. Все показатели не имели статистически достоверных межгрупповых различий ($p > 0,05$), на основании чего можно сделать заключение об отсутствии влияния уровня ТТГ на результативность схем овариальной стимуляции с точки зрения эмбриологической эффективности. Так, количество полученных в обеих группах blastocyst было сопоставимо и составляло 45,45 и 42,86 % соответственно ($U = 4664,50$; $p = 0,835$).

Наконец, с целью оценки эффективности и безопасности программ ВРТ у пациентов с различным уровнем ТТГ проведен сравнительный анализ исходов экстракорпорального оплодотворения у женщин исследуемых групп (табл. 9).

Данные, представленные в табл. 9, свидетельствуют об отсутствии статистически значимых межгрупповых различий по основным параметрам оценки результатов ЭКО. С целью исключения системных конфаундеров в проведенном исследовании в качестве положительного результата программ ЭКО нами расценивалось понятие клинической беременности при ультразвуковом выявлении плодного яйца в полости матки либо вне ее на 21-й день после ПЭ. Для оценки эффективности ЭКО нами проанализирована частота наступления беременности в расчете на трансвагинальную пункцию фолликулярной жидкости, т. е. на количество проведенных процедур ЭКО. Отмечены высокие показатели эффективности программ ЭКО в обеих группах. Так, показатели частоты наступления беременности были сопоставимы и составляли 57 (60,64 %) случаев в 1-й группе и 52 (51,49 %) во 2-й группе ($\chi^2 = 1,304$; $p = 0,254$).

Таблица 9. Исходы экстракорпорального оплодотворения у пациентов исследуемых групп

Table 9. *In vitro* fertilization results in the patients of studied groups

Показатель	Группа 1 (n = 94)		Группа 2 (n = 101)		Статистическая значимость различий	
	Всего	%	Всего	%	$\chi^2_{1,2}$	$p_{1,2}$
Частота наступления беременности	57	60,64	52	51,49	1,304	0,254
Эктопические беременности	0	–	1	0,99	–	–
Синдром гиперстимуляции яичников	18	19,15	14	13,86	0,644	0,423
Отмена переноса эмбрионов	5	5,32	10	9,90	0,867	0,352
Самопроизвольное прерывание беременности до 12 недель	9	15,79	5	9,62	0,457	0,500
Прерывание беременности в сроке 12–22 недели гестации	2	3,51	6	11,54	0,14	0,709
Срочные роды	38	66,67	34	65,38	0,004	0,952
Преждевременные роды	8	14,04	6	15,54	0,011	0,919

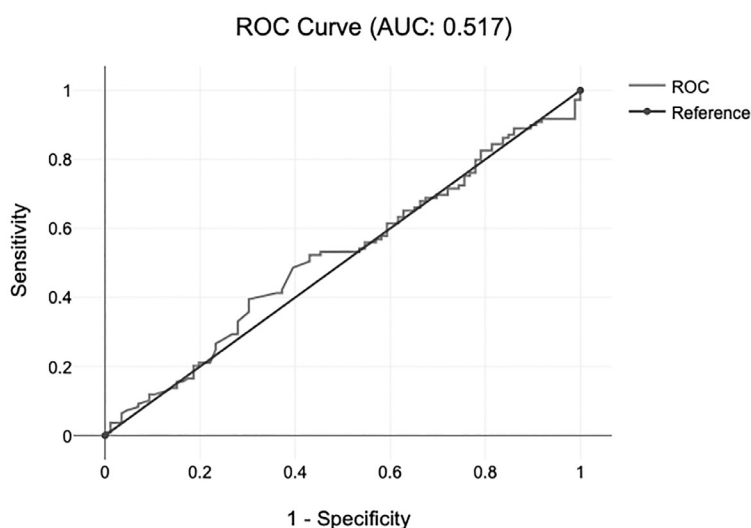
С целью дополнительной оценки информативности концентрации ТТГ в качестве возможного предиктора вероятности наступления беременности проведен ROC-анализ с построением характеристической кривой (рисунок).

Очевидно, что представленная ROC-кривая обладает низким дискриминационным потенциалом ($AUC < 0,7$). В связи с этим уровень ТТГ не является статистически достоверным предиктором наступления беременности и не имеет прогностической значимости в данном исследовании.

Эктопическая беременность отмечена лишь у 1 (0,99 %) женщины во 2-й группе, в то время как в 1-й группе все беременности были локализованы в полости матки.

Синдром гиперстимуляции яичников (СГЯ) наблюдался у 18 (19,15 %) и 14 (13,86 %) пациентов 1-й и 2-й исследуемых групп соответственно ($\chi^2 = 0,644$; $p = 0,423$), при этом отмена ПЭ в связи с ранней формой манифестации СГЯ проводилась у 5 (5,32 %) женщин 1-й группы и у 10 (9,90 %) пациентов 2-й группы, что также не имело статистически достоверных межгрупповых различий ($\chi^2 = 0,867$; $p = 0,352$).

Отдельно следует отметить преобладание одноплодных беременностей. Так, в 1-й группе из 57 наступивших беременностей 49 (85,96 %) одноплодные, 7 (12,28 %) двойни и 1 (1,75 %) тройня. Во 2-й группе из 52 беременностей 41 (78,85 %) одноплодная, 10 (19,23 %) двойни и 1 (1,92 %) тройня. Показатели частоты наступления многоплодных беременностей у женщин обеих групп достоверно не различались ($\chi^2 = 0,957$; $p = 0,328$).



ROC-кривая зависимости наступления беременности от уровня ТТГ до начала протокола ЭКО

ROC curve of the relationship between pregnancy and TSH level before the start of IVF protocol

Репродуктивные потери в первом триместре (до 12 недель) отмечались у 9 (15,79 %) женщин 1-й группы, самопроизвольные аборт в сроке до 12 недель – у 5 (9,62 %) пациентов 2-й группы, причем все самопроизвольные аборты произошли у женщин с одноплодной беременностью ($\chi^2 = 0,457$; $p = 0,500$).

Самопроизвольное прерывание беременности в сроке с 12-й по 22-ю неделю беременности произошло у 2 (3,51 %) женщин 1-й исследуемой группы и у 6 (11,54 %) пациентов 2-й группы, однако статистически значимой достоверности эти различия не достигли ($\chi^2 = 0,14$; $p = 0,709$).

Наступившие беременности завершились срочными родами у 38 (66,67 %) и 34 (65,38 %) женщин 1-й и 2-й исследуемых групп соответственно ($\chi^2 = 0,004$; $p = 0,952$), в то время как преждевременные роды произошли у 8 (14,04 %) и 6 (15,54 %) женщин 1-й и 2-й групп соответственно ($\chi^2 = 0,011$; $p = 0,919$), при этом все случаи преждевременных родов отмечались у женщин с многоплодной беременностью, что подтверждает целесообразность стратегии переноса одного эмбриона в полость матки с целью снижения рисков неблагоприятных перинатальных исходов.

На основании полученных результатов можно сделать следующий вывод: так называемый «высокий нормальный» уровень ТТГ (2,5–4,0 мМЕ/л) у женщин при условии эутиреоидного статуса не оказывает негативного влияния на параметры контролируемой овариальной стимуляции и на эффективность программ ЭКО, что подтверждается сопоставимыми показателями частоты наступления беременности в исследуемых группах, а также сравнимыми показателями репродуктивных потерь, таких как прерывание беременности в первом триместре и в сроке гестации 12–22 недели. Более того, прекоцепционный уровень ТТГ в диапазоне 2,5–4,0 мМЕ/л не ассоциирован с возрастанием вероятности преждевременных родов. Таким образом, поскольку снижение ТТГ до уровня не более 2,5 мМЕ/л является нецелесообразным, это не позволяет оптимизировать исходы программ ЭКО, удлиняя интервал ожидания до начала контролируемой овариальной стимуляции.

Заключение. В результате проведенного исследования установлено, что у женщин с концентрацией ТТГ 2,5–4,0 мМЕ/л при условии эутиреоидного статуса не отмечалось статистически значимых различий в сравнении с женщинами, концентрация ТТГ у которых не превышала 2,5 мМЕ/л, по таким параметрам, как ИМТ, возраст менархе, длительность менструации и менструального цикла, а также частота нарушений менструальной функции (аномальные маточные кровотечения, хроническая ановуляция и др.). Эмбриологические параметры эффективности контролируемой овариальной стимуляции в программе ЭКО показали сравнимое качество роста фолликулов, созревания яйцеклеток, процент фертилизации и образования бластоцист в обеих группах. Установлено отсутствие зависимости эффективности программ ЭКО от прекоцепционного уровня ТТГ, если данный показатель находится в диапазоне 2,5–4,0 мМЕ/л. Так, отмечается сопоставимая частота наступления беременности (60,64 и 51,49 %; $\chi^2 = 1,304$, $p = 0,254$), частота самопроизвольного прерывания беременности в первом триместре (15,79 и 9,62 %; $\chi^2 = 0,457$, $p = 0,500$), частота поздних самопроизвольных выкидышей в сроке гестации 12–22 недели (3,51 и 11,54 %; $\chi^2 = 0,14$, $p = 0,709$). Также установлено, что прекоцепционный уровень ТТГ в диапазоне 2,5–4,0 мМЕ/л не оказывает негативного влияния на частоту преждевременных родов (14,04 и 15,54 %; $\chi^2 = 0,011$, $p = 0,919$). Резюмируя изложенное выше, авторы исследования делают заключение, что в соответствии с современными мировыми тенденциями и результатами собственных исследований нет необходимости в коррекции уровня ТТГ в сыворотке крови до значений 2,5 мМЕ/л и менее, учитывая отсутствие корреляционной взаимосвязи эффективности программ ЭКО и значений ТТГ у женщин с эутиреоидным статусом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Fazeli, P. Response to the letter to the editor: “Higher TSH levels within the normal range are associated with unexpected infertility” / P. Fazeli, H. Lee // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2018. – Vol. 103, N 8. – P. 3112–3113. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00704>
2. Unuane, D. Impact of thyroid disease on fertility and assisted conception / D. Unuane, B. Velkeniers // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2020. – Vol. 34, N 4. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101378>
3. Thyroid hormones and functional ovarian reserve: systemic vs. peripheral dysfunctions / M. Colella [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2020. – Vol. 9. – Art. 1679 <https://doi.org/10.3390/jcm9061679>

4. Silva, J. F. Thyroid hormones and female reproduction / J. F. Silva, N. M. Ocarino, R. Serakides // *Biol. Reprod.* – 2018. – Vol. 99, N 5. – P. 907–921. <https://doi.org/10.1093/biolre/iory115>
5. Subclinical hypothyroidism in the infertile female population: a guideline / Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. 104, N 3. – P. 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.05.028>
6. Preconceptional thyroid stimulating hormone level and fecundity: a community-based cohort study of time to pregnancy / Y. Zhong [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2023. – Vol. 119, N 2. – P. 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.10.025>
7. Subclinical elevations of thyroid-stimulating hormone and assisted reproductive technology outcomes / K. Michalakis [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 95, N 8. – P. 2634–2637. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.02.056>
8. Effect of thyroid function on assisted reproduction outcomes in euthyroid infertile women: A single center retrospective data analysis and a systematic review and meta-analysis / V. D'Assunção [et al.] // *Front. Endocrinol.* – 2022. – Vol. 13. – Art. 1023635. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1023635>
9. 2021 European thyroid association guideline on thyroid disorders prior to and during assisted reproduction / K. Poppe [et al.] // *Eur. Thyroid J.* – 2020. – Vol. 9, N 6. – P. 281–295. <https://doi.org/10.1159/000512790>
10. О вопросах применения вспомогательных репродуктивных технологий [Электронный ресурс] : постановление М-ва здравоохран. Респ. Беларусь, 24 дек. 2019 г., № 124 // Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь. – Режим доступа: <https://etalonline.by/document/?regnum=w22035340>. – Дата доступа: 25.08.2024.

References

1. Fazeli P., Lee H. Response to the letter to the editor: “Higher TSH Levels within the normal range are associated with unexpected infertility”. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2018, vol. 103, no. 8, pp. 3112–3113. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00704>
2. Unuane D., Velkeniers B. Impact of thyroid disease on fertility and assisted conception. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2020, vol. 34, no. 4, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101378>
3. Colella M., Cuomo D., Giacco A., Mallardo M., De Felice M., Ambrosino C. Thyroid hormones and functional ovarian reserve: systemic vs. peripheral dysfunctions. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, vol. 9, art. 1679. <https://doi.org/10.3390/jcm9061679>
4. Silva J. F., Ocarino N. M., Serakides R. *Thyroid hormones and female reproduction. Biology of Reproduction*, 2018, vol. 99, no. 5, pp. 907–921. <https://doi.org/10.1093/biolre/iory115>
5. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Subclinical hypothyroidism in the infertile female population: a guideline. *Fertility and Sterility*, 2015, vol. 104, no. 3, pp. 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.05.028>
6. Zhong Y., Sujian P., Qiujun C., Dongyin H., Guanglan Z., Zehong Z. Preconceptional thyroid stimulating hormone level and fecundity: a community-based cohort study of time to pregnancy. *Fertility and Sterility*, 2023, vol. 119, no. 2, pp. 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.10.025>
7. Michalakis K. G., Mesen T. B., Brayboy L. M., Yu B., Richter K. S., Levy M., Widra E., Segars J. H. Subclinical elevations of thyroid-stimulating hormone and assisted reproductive technology outcomes. *Fertility and Sterility*, 2011, vol. 95, no. 8, pp. 2634–2637. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.02.056>
8. d'Assunção V. R. N., Montagna E., d'Assunção L. E. N., Caldas M. M. P., Christofolini D. M., Barbosa C. P., Negreiros R. A. M., Laganà A. S., de Oliveira R., Bianco B. Effect of thyroid function on assisted reproduction outcomes in euthyroid infertile women: A single center retrospective data analysis and a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, vol. 13, art. 1023635. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1023635>
9. Poppe K., Bisschop P., Fugazzola L., Minziori G., Unuane D., Weghofer A. 2021 European Thyroid Association Guideline on Thyroid Disorders prior to and during Assisted Reproduction. *European Thyroid Journal*, 2020, vol. 9, no. 6, pp. 281–295. <https://doi.org/10.1159/000512790>
10. Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus “On the use of assisted reproductive technologies” of December 24, 2019, no. 124. *National Legal Internet Portal of the Republic of Belarus*. Available at: <https://etalonline.by/document/?regnum=w22035340> (accessed 24.08.2024) (in Russian).

Информация об авторах

Жуковская Светлана Викторовна – доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dr.zhukovskaya@gmail.com

Можейко Людмила Федоровна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lfmozheiko@gmail.com

Information about the authors

Svetlana V. Zhukovskaya – Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dr.zhukovskaya@gmail.com

Lyudmila F. Mozheiko – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lfmozheiko@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)
 ISSN 2524-2350 (Online)
 УДК 616.833-009.7-073.7
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-316-325>

Поступила в редакцию 08.12.2024
 Received 08.12.2024

В. И. Ходулев¹, О. В. Кобылко², А. А. Ковалев³

¹Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии,
 Минск, Республика Беларусь

²Гомельская областная клиническая больница, Гомель, Республика Беларусь

³Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Республика Беларусь

ЭЛЕКТРОНЕЙРОМИОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЗДНИХ ОТВЕТОВ ПРИ РАДИКУЛОПАТИИ S1

Аннотация. Электрофизиологические методы исследования, в частности поздние ответы нервной проводимости, играют важную роль в диагностике ряда нейрогенных расстройств, в том числе при пояснично-крестцовой радикулопатии. К поздним ответам относятся F-волна, H-рефлекс и A-волна.

Цель данного исследования – установить диагностическую значимость поздних ответов при стимуляции большеберцового нерва у пациентов с изолированной радикулопатией S1 в сопоставлении с клиническими данными.

Всего было обследовано 32 пациента с изолированной радикулопатией S1 (16 женщин, 16 мужчин), средний возраст которых составил $43,5 \pm 9,3$ года. При электронейромиографическом исследовании большеберцового нерва на поврежденной стороне выявлено наличие A-волны у 20 пациентов (62,5 %, $p < 0,001$). Она достоверно чаще сочеталась с тестами на раздражение спинномозгового корешка, а ее локализация перед F-волной являлась отличительной чертой этой патологии. Анализ параметров F-волны показал, что ее длительность была больше ($p = 0,001$), чем на неповрежденной стороне, а в контрольной группе отмечалось пролонгирование как длительности, так и латентности ($p < 0,001$). Пациенты с наличием A-волны имели более выраженные изменения длительности и латентности F-волны на поврежденной и неповрежденной сторонах. При анализе H-рефлекса установлено его отсутствие у 14 (43,8 %) пациентов и снижение его амплитуды на стороне повреждения у 9 (28,1 %) человек. Отсутствие H-рефлекса достоверно чаще выявлялось у пациентов с отсутствием ахиллова рефлекса ($p < 0,05$). Количество пациентов с наличием A-волны не отличалось от количества пациентов с увеличенной длительностью F-волны или со снижением амплитуды H-рефлекса ($p > 0,05$).

Ключевые слова: пояснично-крестцовая радикулопатия S1, электронейромиография, поздние ответы, A-волна, F-волна, H-рефлекс

Для цитирования: Ходулев, В. И. Электронейромиографическая характеристика поздних ответов при радикулопатии S1 / В. И. Ходулев, О. В. Кобылко, А. А. Ковалев // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 4. – С. 316–325. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-316-325>

Vasily I. Khodulev¹, Aleh V. Kabyłka², Aleksey A. Kovalev³

¹Republican Research and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Republic of Belarus

²Gomel Regional Clinical Hospital, Gomel, Republic of Belarus

³Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

CHARACTERISTICS OF LATE RESPONSES IN S1 RADICULOPATHY

Abstract. Electrophysiological research methods, in particular late nerve conduction responses, play an important role in the diagnosis of a number of neurogenic disorders and, in particular in lumbosacral radiculopathy. Late responses include the F-wave, H-reflex, and A-wave.

The purpose of this study was to determine the diagnostic value of late responses to tibial nerve stimulation in patients with isolated S1 radiculopathy in comparison with clinical findings. We examined 32 patients with isolated S1 radiculopathy (16 women, 16 men), their average age was 43.5 ± 9.3 years.

An electroneuromyographic study of the tibial nerve on the injured side revealed the presence of an A-wave in 20 patients (62.5 %, $p < 0.001$). It was significantly more often combined with tests for spinal root irritation, and its localization before the F-wave was a characteristic feature of this pathology. The analysis of the F-wave parameters showed an increase in its duration ($p = 0.001$) compared to the uninjured side, and compared to the control group there was a prolongation of both duration and latency ($p < 0.001$). Patients with the presence of an A-wave had more pronounced changes in the duration and latency of the F-wave on the injured and uninjured sides. When analyzing the H-reflex, it was found to be absent in 14 (43.8 %) and decreased in amplitude in 9 (28.1 %) patients on the injured side. The absence of the H-reflex was

significantly more often detected in patients with the absence of the Achilles reflex ($p < 0.05$). The number of patients with the presence of an A-wave did not differ from that of patients with an increased duration of the F-wave or a decrease in the amplitude of the H-reflex ($p > 0.05$).

Keywords: isolated lumbosacral radiculopathy S1, electroneuromyography, A-wave, F-wave, H-reflex

For citation: Khodulev V. I., Kabyłka A. V., Kovalev A. A. Characteristics of late responses in S1 radiculopathy. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 4, pp. 316–325 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-316-325>

Введение. Пояснично-крестцовые радикулопатии представляют собой серьезную проблему в клинической практике. До 90 % радикулопатий возникают на пояснично-крестцовом уровне и до 80 % затрагивают корешки L5 и S1. Однако из-за многогранного характера этого состояния не всегда возможна постановка окончательного диагноза, основанного на физическом осмотре и нейровизуализационных методах. Корешки L5 и S1 иннервируют мышцы, обычно используемые для записи F-волн, а именно мышцы стопы – короткий разгибатель пальцев и мышцу, отводящую большой палец стопы. Электрофизиологические методы исследования, в частности поздние ответы нервной проводимости, играют важную роль в диагностике ряда нейрогенных расстройств, в том числе при пояснично-крестцовой радикулопатии. К поздним ответам относятся F-волна, H-рефлекс и A-волна [1].

F-волна является одним из наиболее часто используемых поздних ответов в клинической нейрофизиологии. Она является неинвазивной процедурой, сопровождающейся минимальной болью и дискомфортом в отличие от игольчатой ЭМГ. F-волна представляет собой поздний мышечный потенциал действия, который возникает в результате антидромной активации мотонейронов вследствие электрической стимуляции периферических нервов [2]. При этом активация самых крупных мотонейронов происходит, как правило, в случайном порядке. Поэтому по своей природе F-волны различаются по латентности, амплитуде, площади, длительности и морфологии. В клинической электрофизиологии оценивают минимальный ($F_{\text{мин}}$), максимальный ($F_{\text{макс}}$) и средний ($F_{\text{ср}}$) латентные периоды, хронодисперсию ($F_{\text{хр}}$), среднюю длительность ($F_{\text{дл}}$), представленность, или персистенцию, F-волн и ряд других показателей.

Латентный период F-волны отражает время проведения ответа между точкой стимуляции и спинным мозгом, время реактивации мотонейрона и время, в течение которого центробежный потенциал действия распространится в дистальном направлении и активирует двигательную единицу. $F_{\text{хр}}$ определяет разницу между минимальной и максимальной латентностью и, таким образом, отражает их диапазон в серии (популяции) F-волн. Представленность F-волн означает процент регистрируемых ответов после серии стимуляций (обычно 8–16 стимулов). $F_{\text{дл}}$ измеряют от начала возникновения ответа до его возвращения к изолинии. Она отражает дисперсию проведения ответа между наиболее быстропроводящими моторными волокнами и волокнами с меньшей скоростью проведения.

Однако имеющиеся данные, подтверждающие использование F-волн при пояснично-крестцовой радикулопатии, довольно противоречивы. Большинство разногласий, касающихся использования F-волн, вызвано неспособностью адекватно учитывать требования, предъявляемые к анализу F-волн. Эти требования включают определение количества F-волн, которые необходимо записать, параметров, которые следует оценить, и мышц, от которой идет регистрация F-волны. Большинство лабораторий в ежедневной рутинной практике наиболее часто используют $F_{\text{мин}}$ из серии F-волн [3–5]. Однако $F_{\text{мин}}$ остается нормальной, если хотя бы одно быстропроводящее двигательное волокно остается неизменным. Аналогично, $F_{\text{макс}}$ также может быть увеличена, если изменено только одно медленное волокно, несмотря на целостность остальных аксонов. Поэтому ряд авторов считают, что $F_{\text{ср}}$ как усредненная мера всех выживших аксонов может быть предпочтительнее крайних значений $F_{\text{мин}}$ или $F_{\text{макс}}$ [1]. Кроме того, для достижения воспроизводимости $F_{\text{ср}}$ требуется меньшее количество стимулов по сравнению с $F_{\text{мин}}$ или $F_{\text{макс}}$, что важно для пациентов, которые не переносят большое количество стимуляций, необходимых для получения точных результатов [2, 6]. Показано, что $F_{\text{мин}}$ и $F_{\text{ср}}$ редко являются аномальными по сравнению с предполагаемой $F_{\text{мин}}$. В другом исследовании показано, что $F_{\text{макс}}$ является наиболее чувствительным параметром [4]. Ряд авторов считают, что $F_{\text{хр}}$ считается значимым показателем

в диагностике, а для анализа необходимо проведение 32 стимулов [2, 6]. Однако в недавнем исследовании показана низкая диагностическая чувствительность этого показателя [7]. Сообщалось также, что F_{xp} зависит от роста, тогда как другие авторы показали, что F_{xp} остается одинаковой независимо от роста и длины конечностей. Сочетание $F_{мин}$ с другими измерениями, такими как F_{xp} , $F_{дл}$ и повторные ответы, может дать еще более высокий уровень диагностической информации для оценки пациентов с пояснично-крестцовыми радикулопатиями [8]. Кроме того, отдельные пики F-волн могут накладываться друг на друга, и их можно спутать с A-волной [9].

A-волна является типом позднего ответа, который часто упускается из виду. Она представляет собой разновидность мышечного потенциала действия, который имеет постоянную форму и латентный период и может быть обнаружен при исследовании F-волны [9, 10]. В настоящее время имеется мало информации об этом феномене и, соответственно, нет рекомендаций по интерпретации A-волн, а только констатируется их наличие или отсутствие при рутинном исследовании F-волн [11]. A-волны гетерогенны и могут быть вызваны несколькими нейрофизиологическими механизмами, такими как мио- или трансаксональная эфферентная передача потенциала действия от одного аксона к другому, экстрааксональный разряд, вызванный афферентным потенциалом действия, или коллатеральное прорастание нервных волокон во время регенерации аксонов [8, 12, 13]. Высказано предположение, что демиелинизация является основным патофизиологическим коррелятом A-волны [14–17].

A-волна выявляется при ряде нейрогенных расстройств, в том числе и при радикулопатиях. Они чаще регистрируются при проксимальных поражениях нерва, реже – при дистальных повреждениях [18]. Показано, что A-волна присутствует в 14–25 % нервов нижних конечностей у здоровых людей, однако их частота также увеличивается с возрастом, что заставило некоторых исследователей предположить, что A-волны могут коррелировать с возрастными дегенеративными изменениями альфа-мотонейронов в здоровой популяции [9]. Кроме того, установлено, что наличие A-волны является предиктором развития будущей невропатии и радикулопатии, на основании чего было сделано предположение, что A-волна представляет собой раннее проявление нарушения проводимости [12]. Ранее нами была продемонстрирована клинически значимая диагностическая ценность этого элемента при корешковой боли, обусловленной патологией S1 корешка и проявляющейся в виде изолированной невропатической боли в голени [16]. Следовательно, значение A-волны в диагностике и механизмы ее образования до конца не выяснены [9, 12, 18].

Исследование H-рефлекса позволяет оценить как сенсорные (афферентная дуга), так и двигательные волокна (эфферентная дуга), иннервирующие икроножно-камбаловидный комплекс при стимуляции большеберцового нерва. При повреждении корешка S1 могут наблюдаться асимметричное удлинение латентного периода, снижение амплитуды H-рефлекса или его отсутствие. Сообщалось о чувствительности 50 % и специфичности 91 % при исследовании H-рефлекса при радикулопатии S1, а также о высокой диагностической и прогностической ценности при радикулопатии S1 [1, 19].

В связи с изложенным выше ряд авторов указывают на необходимость дальнейшего исследования других более сложных параметров поздних ответов при пояснично-крестцовой радикулопатии [3].

Цель данного исследования – изучение клинических данных и показателей поздних электрофизиологических ответов F-волн, A-волн, H-рефлекса и оценка их диагностической значимости у пациентов с изолированной радикулопатией S1. В этом исследовании был сделан акцент на выявлении A-волны и на особенностях клинических данных и параметров F-волны при ее наличии при тестировании большеберцового нерва.

Материалы и методы исследования. Нами обследовано 32 пациента с изолированной радикулопатией S1 (16 женщин, 16 мужчин) в возрасте 22–60 ($43,5 \pm 9,3$) лет при росте $172,3 \pm 9,7$ см. Все обследуемые были разделены на две группы. Первую группу составили пациенты, у которых была выявлена A-волна, вторую группу – лица, у которых она отсутствовала. Кроме того, эти группы были разделены на подгруппы: 1А и 2А – пациенты с поврежденной стороной, 1Б и 2Б – с неповрежденной стороной. Контрольную группу составили 40 здоровых доброволь-

цев (24 женщины, 16 мужчин) в возрасте 23–57 ($34,4 \pm 11,8$) лет при росте $168,7 \pm 9,4$ см. Исследование было одобрено этическим комитетом учреждения «Гомельская областная клиническая больница». Все пациенты и добровольцы контрольной группы дали свое информированное согласие на исследование.

Критерии включения в исследование: жалобы на боли в ноге ниже коленного сустава в распределении дерматома S1 изолированно или в сочетании с болями в бедре и поясничной области; снижение ахиллова рефлекса; снижение силы в мышцах сгибателях стопы, а также наличие парамедианной грыжи межпозвонкового диска L5–S1 соответствующей латерализации, компрессирующей корешок S1 по данным магнитно-резонансной или компьютерной томографии.

Критерии исключения из исследования: возраст младше 18 и старше 70 лет, наличие сахарного диабета, системных заболеваний, злокачественных новообразований в анамнезе, клинических или электрофизиологических признаков полиневропатии, предыдущий прием пациентом лекарств, считающихся токсичными для периферической нервной системы.

Методика *электронейромиографического* (ЭНМГ) исследования малоберцового, большеберцового и икроножного нервов была выполнена по стандартной методике и описана ранее [5]. F-волны регистрировали при стимуляции большеберцового нерва в дистальной и проксимальной точках. При стимуляции катод располагали проксимально, чтобы избежать анодного блокирования антидромно распространяющихся импульсов. При исследовании F-волн проводили серию из 16–20 последовательных стимуляций с частотой 1 Гц. Длительность стимула составляла 0,1–0,2 мс, сопротивление – <5 кОм, усиление – 200–500 мкВ/дел, развертка – 5–10 мс/дел. Технику фасилитации не использовали. Анализировали следующие параметры F-волн: F_{\min} , $F_{\text{ср}}$, F_{\max} , $F_{\text{хр}}$, $F_{\text{дл}}$, а также длительность всего комплекса серии F-волн ($F_{\text{дл}}$ комплекса). $F_{\text{дл}}$ комплекса определяли как разницу между F_{\min} и максимальной латентностью окончания F-волны в серии из всех записей. $F_{\text{дл}}$ комплекса использована нами в качестве нового параметра, который можно быстро оценить в растровом (raster) или наложенном (superimposed) режиме [20]. Поскольку F_{\min} зависит от роста ($R = 0,696$), она была скорректирована с помощью индекса, который рассчитывали по формуле: латентность F-волны (мс)/рост (м). Минимальная амплитуда, используемая для идентификации F-волн, составляла 20 мкВ, или 1 % от амплитуды M-ответа. Полученные показатели с поврежденной стороны сравнивали с показателями неповрежденной стороны и в контрольной группе. Кроме того, нами проанализирована форма F-волны при наложенном режиме и определено количество визуально видимых повторяемых пиков F-волн в серии последовательных стимуляций. Нами сделано предположение, что повторяемые пики F-волн могут отражать наличие A-волны на F-волне, т. е. являться истинными A-волнами.

A-волну записывали при исследовании F-волны. При регистрации A-волны анализ включал определение места ее расположения, латентности, амплитуды, площади, длительности и частоты регистрации при исследовании F-волны. Идентификация A-волны проводилась на основании одинаковой латентности, амплитуды и формы. H-рефлекс регистрировали с камбаловидной мышцы, активный электрод располагали на середине расстояния между центром подколенной ямки и ахилловым сухожилием в области проекции брюшка мышцы, референтный – над ахилловым сухожилием. Стимуляцию большеберцового нерва выполняли в области подколенной ямки, при этом катод располагали дистальнее анода. Длительность стимула составляла 0,5 мс, частота – 0,3 Гц, с каждым стимулом сила тока увеличивалась на 1 мА. Анализировали отсутствие и снижение амплитуды H-рефлекса. Снижение амплитуды определяли по соотношению амплитуд поврежденной и неповрежденной сторон. В контрольной группе этот показатель составил $0,8 \pm 0,1$.

Проверку соответствия распределения количественных признаков модели нормального распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Описание нормально распределенных количественных признаков приводили в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$), а в случае, когда распределение количественных показателей отличалось от нормального, данные представляли в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей ($Me (Q_{25}–Q_{75})$). Для выявления различий между независимыми группами количественных показателей использовали тест Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным попарным сравнением групп

с помощью теста Данна. При множественных сравнениях применяли поправку Холма. Клиническую значимость количественных показателей оценивали при помощи ROC-анализа. Оптимальный порог отсечения значений показателей определяли методом Йодена (Youden's J. statistic). Для сравнения площадей под ROC-кривыми применяли тест ДеЛонга (DeLong test). Результаты ROC-анализа представлены в виде величины площади под ROC-кривой (AUC), чувствительности (Se, %) и специфичности (Sp, %). При интервале площадей 0,9–1,0 качество модели оценивали как отличное, при 0,8–0,9 – как очень хорошее, при 0,7–0,8 – как хорошее, при 0,6–0,7 – как среднее, при 0,5–0,6 – как неудовлетворительное. Уровень значимости (α) был принят равным 0,05. Для анализа корреляции между показателями использовали коэффициент Пирсона.

Результаты и их обсуждение. При обследовании 32 пациентов с изолированной радикулопатией S1 правосторонняя локализация симптоматики наблюдалась у 15 человек, левосторонняя – у 17. У всех пациентов болевой синдром носил непостоянный характер и проявлялся преимущественно в нижних конечностях. Боли в голени в сочетании или без сочетания с болями в поясничной области возникали утром после длительного нахождения в горизонтальном положении у 15 человек, при ходьбе на расстояние 100 м – у 11, при сидении – у 11, при наклоне туловища – у 4, при подъеме тяжести – у 2 пациентов. Облегчение болевого синдрома, возникшего при длительном сидении или нахождении в горизонтальном положении, наблюдалось при смене положения тела: при ходьбе – у 18 пациентов, при необходимости принять вынужденную позу – у 17, при принятии горизонтального положения – у 8, после горячего душа – у 4, в положении сидя – у 3 человек. Чувствительные нарушения в области наружного края стопы выявлены у 31 пациента, мышечная слабость в сгибателях стопы (невозможность стоять на носках) – у 11, снижение или выпадение ахиллова рефлекса – у 29 человек. У всех обследуемых выявлены парамедианная грыжа межпозвонкового диска L5–S1 с соответствующей болевому синдрому латерализацией, а также снижение высоты межпозвонковых дисков.

При ЭНМГ-исследовании малоберцового нерва А-волна не была зарегистрирована. При тестировании большеберцового нерва у всех пациентов регистрировалась F-волна на каждый подаваемый стимул, а на поврежденной стороне наличие А-волны обнаружено у 20 пациентов (62,5 %, $p < 0,001$). Эта группа пациентов составила первую группу. Вторую группу с отсутствием А-волны составили 12 пациентов. Показатели продолжительности, интенсивности и характера болевого синдрома у пациентов этих групп не отличались ($p > 0,05$). Различий в чувствительной, двигательной и рефлекторной сферах между пациентами двух групп также не наблюдалось ($p > 0,05$). Тест «кашлевого толчка» значительно чаще встречался в первой группе (14 (70 %) пациентов), чем во второй (3 (25 %) пациента), $p = 0,038$. Положительный тест Ласега также наблюдался чаще у пациентов с наличием А-волны (19 (95 %) пациентов), чем у пациентов второй группы (6 (50 %) человек), $p = 0,032$. Достоверных различий в наличии протрузии, экстррузии или секвестрированной грыжи, а также в их размере между пациентами групп не выявлено ($p > 0,05$). Кроме того, не выявлено различий между пациентами, профессии которых были связаны или не связаны с физической работой. Таким образом, А-волна достоверно чаще сочеталась с тестами на раздражение спинномозгового корешка.

В общей группе амплитуда Н-рефлекса была изменена в 71,9 % случаев. Н-рефлекс не зарегистрирован у 14 (43,8 %) человек, а снижение его амплитуды отмечалось у 9 (28,1 %) пациентов на стороне повреждения и у 1 (3,1 %) на неповрежденной стороне ($p < 0,001$). В контрольной группе Н-рефлекс регистрировался в 100 % случаев. В подгруппе 1А Н-рефлекс отсутствовал у 9 (45,0 %) пациентов, а в подгруппе 2А – у 5 (41,7 %), $p < 0,05$. У 11 (78,6 %) пациентов с отсутствием Н-рефлекса отмечалось отсутствие ахиллова рефлекса, а из 18 (56,3 %) пациентов с наличием Н-рефлекса ахиллов рефлекс отсутствовал только у 5 (27,8 %), $p = 0,006$. Взаимосвязи между Н-рефлексом и мышечной слабостью не выявлено ($p > 0,05$). Подобные результаты были получены при анализе латентного периода Н-рефлекса, который в 62,5 % случаев увеличивался как на поврежденной, так и на неповрежденной стороне у пациентов с радикулопатией L5/S1 [4]. Авторы объясняют это тем, что грыжа диска имеет тенденцию поражать оба нервных корешка, хотя одна сторона остается субклинической. Имеются также данные, что у всех пациентов с аномальным ахилловым рефлексом отмечалась пролонгированная латентность Н-рефлекса.

В подгруппе 1А при дистальной стимуляции А-волна располагалась отдельно, непосредственно перед F-волной (15 (75 %) пациентов, $p < 0,001$), в самом начале F-волны, соединяясь с ней (5 (25 %) человек). У 1 (5 %) пациента было зарегистрировано одновременно две А-волны, которые локализовались перед F-волной и в ее начале. При проксимальной стимуляции А-волна перед F-волной была зарегистрирована у 11 (55 %) пациентов. Параметры А-волны, локализуемой перед F-волной, представлены в табл. 1. Различие между латентностью А-волны и F_{cp} составила $3,4 \pm 1,9$ мс. В ряде случаев А-волна носила нестойкий характер – имела различную представленность в серии F-волн (47,5 (36,3; 80,0) %). В подгруппе 1Б А-волна выявлена у 7 (21,9 %) пациентов. У 1 пациента она локализовалась между М-ответом и F-волной, у 4 – непосредственно перед F-волной и у 2 – сразу после F-волны.

Таблица 1. Параметры А-волны у пациентов с радикулопатией S1

Table 1. A-wave parameters in the patients with S1 radiculopathy

Точка стимуляции	Латентность, мс	Амплитуда, мкВ	Площадь, мкВ·мс	Длительность, мс	Представленность, %
Дистальная (мин.–макс.), $n = 20$	$51,7 \pm 6,2$ (42,9–70,4)	77,7 (55,2; 121,0) (21,1–500,0)	82,6 (57,7; 158,8) (13,5–494,0)	$2,9 \pm 0,5$ (2,0–9,4)	47,5 (36,3; 80,0) (25,0–100,0)
Проксимальная (мин.–макс.), $n = 11$	$46,9 \pm 4,9$ (41,4–52,1)	82,3 (48,8; 138) (36,1–500,0)	85,9 (56,4; 170) (37,6–37,9)	3 (2,3; 3,5) (2,2–9,3)	59,8 (48,2; 54,2) (30,0–100,0)

Типичная картина локализации А-волны у пациентки с невропатической болью, обусловленной раздражением S1 корешка, приведена в работе [16]. Тоюкира с соавт. показали наличие вероятной А-волны перед F-волной у пациента с легкой радикулопатией S1, вызванной грыжей межпозвоночного диска [8]. А-волна может располагаться перед, в начале, в середине, в конце или после F-волны. Она, по-видимому, формируется теми двигательными волокнами, потенциалы действия которых не подвержены затуханию при формировании F-волны и не блокируются потенциалами действия, исходящими дистально от места раздражения или проксимально от возбужденных мотонейронов.

При анализе повторяемых пиков на F-волне в общей группе пациентов они были выявлены у 6 (18,8 %) человек, в подгруппах 1А и 1Б – у 1 пациента в каждой подгруппе. В то же время в подгруппе 2А повторяемые пики были зарегистрированы у 3 (25,0 %) пациентов, а подгруппе 2Б – у 1 человека, что в общем составило 33,3 % случаев. Таким образом, если предположить, что повторяемый пик на F-волне является А-волной, то встречаемость А-волны при радикулопатии S1 возросла с 20 (62,5 %) до 24 (75,0 %) случаев.

Параметры F-волны в зависимости от наличия А-волны на поврежденной и неповрежденной сторонах представлены в табл. 2. Для подгруппы 1А было характерно повышение длительности ($p = 0,001$), но не латентности F-волны ($p > 0,05$) по сравнению подгруппой 1Б (неповрежденная сторона), тогда как по сравнению с контрольной группой было пролонгирование как длительности, так и латентности ($p < 0,001$). В подгруппе 1Б также выявлено повышение латентности и длительности F-волны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). В подгруппе 2А длительность F-волны была пролонгирована ($p < 0,001$), тогда как латентность не изменялась ($p > 0,05$) по сравнению с контрольной группой и эти показатели не отличались по сравнению с подгруппой 2Б. В группе 2Б была увеличена только длительность F-волны ($p < 0,05$). В общей группе пациентов $F_{дл}$ и $F_{дл}$ комплекса была увеличена (62,5 и 68,8 % случаев соответственно).

В связи с трудоёмкостью процессов маркировки и измерения длительности каждой кривой нами предложено использование $F_{дл}$ комплекса серии (популяции) F-волн в качестве нового показателя, который можно быстро оценить в растровом и/или наложенном режимах [20]. Этот показатель оценивает длительность всей популяции F-волн, включая, по-видимому, и А-волну, которую не всегда можно четко отделить от F-волны. Этот показатель был сопоставим с $F_{дл}$ ($p > 0,05$). Кроме того, показатели $F_{дл}$ и $F_{дл}$ комплекса не зависели от роста человека ($R = 0,014$

и $R = -0,082$ соответственно). F_{xp} во всех подгруппах не изменялась по сравнению с данным показателем в контрольной группе. Это объясняется тем, что, как показали недавние исследования, этот показатель может отражать скорее возбудимость двигательных нейронов, чем вариабельность скорости проводимости между различными двигательными волокнами [21].

Таблица 2. Параметры F-волны при исследовании большеберцового нерва в зависимости от наличия А-волны ($M \pm SD$)

Table 2. F-wave parameters in the study of the tibial nerve depending on the presence of the A-wave ($M \pm SD$)

Показатель	Наличие А-волны (n = 20)		Отсутствие А-волны (n = 12)		Контрольная группа 3	p						
	1А*	1Б**	2А*	2Б**		p_{1A-1B}	p_{1A-2B}	p_{1A-3}	p_{2A-2B}	p_{1B-3}	p_{2B-3}	p_{2A-3}
$F_{мин}$, мс	53,8 ± 6,2	52,6 ± 5,0	49,9 ± 4,6	48,4 ± 3,9	47,1 ± 4,7	0,462	0,075	<0,001	0,412	<0,001	0,345	0,085
$F_{макс}$, мс	58,2 ± 5,9	56,8 ± 6,1	54,3 ± 5,4	53,4 ± 4,7	51,5 ± 4,5	0,308	0,061	<0,001	0,680	<0,001	0,197	0,089
F_{cp} , мс	55,9 ± 5,9	54,7 ± 5,5	51,6 ± 4,7	50,9 ± 4,9	49,2 ± 4,4	0,411	0,041	<0,001	0,750	<0,001	0,221	0,125
$F_{мин}/рост$, мс/м	31,4 ± 3,2	30,7 ± 2,2	28,9 ± 1,8	28,0 ± 1,5	28,0 ± 2,0	0,370	0,022	<0,001	0,237	<0,001	0,966	0,190
$F_{макс}/рост$, мс/м	34,0 ± 3,1	33,1 ± 2,8	31,4 ± 2,1	30,8 ± 1,8	30,6 ± 1,8	0,211	0,015	<0,001	0,548	<0,001	0,669	0,233
$F_{cp}/рост$, мс/м	32,6 ± 3,1	31,8 ± 2,4	29,8 ± 1,9	29,4 ± 1,9	29,2 ± 1,8	0,307	0,009	<0,001	0,635	<0,001	0,724	0,329
F_{xp} , мс	4,4 ± 2,0	4,2 ± 2,3	4,5 ± 1,9	5,0 ± 2,0	4,4 ± 1,0	0,360	0,909	0,794	0,588	0,084	0,219	0,755
$F_{дл мин}$, мс	12,8 ± 3,0	11,4 ± 2,4	11,8 ± 2,8	11,2 ± 2,5	9,2 ± 1,7	0,119	0,367	<0,001	0,576	<0,001	0,003	<0,001
$F_{дл макс}$, мс	23,0 ± 4,5	18,6 ± 3,2	21,5 ± 3,4	18,8 ± 3,2	15,7 ± 2,2	0,001	0,316	<0,001	0,073	<0,001	<0,001	<0,001
$F_{дл ср}$, мс	18,4 ± 3,6	14,9 ± 2,1	17,2 ± 3,1	14,9 ± 2,8	12,8 ± 2,2	0,001	0,399	<0,001	0,076	<0,001	0,012	<0,001
$F_{дл комплекса}$, мс	23,7 ± 4,6	18,8 ± 3,4	22,7 ± 3,7	19,3 ± 2,9	16,4 ± 2,2	0,001	0,610	<0,001	0,026	0,002	0,001	<0,001

Примечание. * – поврежденная сторона, ** – неповрежденная сторона, $F_{мин}$, $F_{макс}$, F_{cp} – минимальная, максимальная и средняя латентность F-волны, F_{xp} – хронодисперсия F-волны, $F_{дл}$ – длительность, $F_{дл комплекс}$ – общая длительность всего комплекса серии F-волн.

Проведение ROC-анализа для сравнения показателей длительности и латентности F-волн в подгруппах пациентов (табл. 3) показало, что наибольшее значение площади под кривой (AUC) было у показателей длительности F-волны на стороне повреждения как в группе пациентов с А-волной ($AUC F_{дл ср} = 0,92$, $AUC F_{дл комплекс} = 0,9$), так и в группе пациентов без А-волны ($AUC F_{дл ср} = 0,91$, $AUC F_{дл комплекс} = 0,94$). Несколько худшие результаты продемонстрировал показатель $F_{мин}$ на стороне повреждения в группе пациентов с А-волной ($AUC = 0,82$). Еще хуже был результат у показателя $F_{мин}$ на стороне повреждения в группе пациентов без А-волны ($AUC = 0,66$).

Таким образом, нами выявлено, во-первых, наличие А-волны, локализующейся перед F-волной; во-вторых, пролонгирование длительности F-волны; в-третьих, снижение амплитуды или отсутствие Н-рефлекса; в-четвертых, субклиническое вовлечение в патологический процесс спинномозгового корешка S1 с противоположной, неповрежденной стороны. Кроме того, количество пациентов с наличием А-волны не отличалось от количества пациентов с увеличенной длительностью F-волны или измененным Н-рефлексом ($p > 0,05$). Группа пациентов с наличием А-волны имела достоверно большие изменения параметров нервной проводимости F-волны ($F_{мин}$ и $F_{дл}$) по сравнению с группой без А-волны, что позволяет предположить ее роль в патогенезе забо-

левания, в частности локального демиелинизирующего повреждения нервного корешка. Этот вывод согласуется с результатами исследования, которое показало, что показатель $F_{\text{макс}}$ как наиболее значимый параметр изменялся как на поврежденной, так и на неповрежденной стороне, но не между сторонами [4].

Таблица 3. Результаты ROC-анализа параметров латентности и длительности F-волны по отношению к контрольной группе

Table 3. Results of the ROC analysis of latency and duration parameters of the F-wave in relation to the control group

Показатель	AUC	Se	Sp	Порог отсечения	<i>p</i>
$F_{\text{мин}}$:					
контроль-1А*	0,82	0,8	0,78	29,43	<0,0001
контроль-2А*	0,66	0,83	0,48	27,34	0,07
контроль-1Б**	0,83	0,8	0,72	29,0	<0,0001
контроль-2Б**	0,53	0,83	0,32	27,06	0,756
$F_{\text{дл}}$:					
контроль-1А*	0,92	0,75	1	17,15	<0,001
контроль-2А*	0,91	0,92	0,8	14,56	<0,0001
контроль-1Б**	0,76	0,75	0,78	14,47	<0,0001
контроль-2Б**	0,72	0,75	0,65	13,35	0,01
$F_{\text{дл}}$ комплекс:					
контроль-1А*	0,9	0,75	0,98	19,65	<0,0001
контроль-2А*	0,94	0,83	0,98	19,85	<0,0001
контроль-1Б**	0,72	0,5	1,0	20,25	0,008
контроль-2Б**	0,78	0,5	1,0	20,2	<0,0001

Примечание. * – поврежденная сторона (А), ** – неповрежденная сторона (Б) в группах 1 и 2, $F_{\text{мин}}$ – минимальная латентность F-волны, $F_{\text{дл}}$ – средняя длительность, $F_{\text{дл}}$ комплекса – длительность всего комплекса серии F-волн. AUC – площадь под ROC-кривой, Se – чувствительность, Sp – специфичность.

В патогенезе радикулопатии участвует несколько факторов, включая давление, воспаление и иммунный ответ [4]. Эти факторы могут влиять как на чувствительные волокна, которые представляют собой наибольший объем корешков спинномозговых нервов, так и на двигательные волокна. Из-за меньшего содержания коллагена в нервных корешках по сравнению с периферическими нервами первые структуры более подвержены деформирующим нагрузкам. Все эти факторы приводят не только к воспалению нервных корешков и болевым реакциям, но и к разрушению миелиновой оболочки двигательных и чувствительных волокон. В этих условиях может произойти отражение импульса от места повреждения или обусловленный эфаптической передачей переход потенциала действия от одного нервного волокна к другому и, как следствие, его возвращение к мышце в виде А-волны. Кроме того, конвергенция различных механизмов может привести к появлению А-волн. Следовательно, нейрофизиологические проявления клинической или субклинической двигательной дисфункции могут наблюдаться в виде наличия А-волны.

Заключение. Исследования поздних ответов играют важную роль в электрофизиологической оценке при радикулопатии S1. Среди этих ответов значимую диагностическую ценность представляют такие характеристики, как выявление А-волны, пролонгирование длительности F-волны и отсутствие или снижение амплитуды Н-рефлекса при исследовании большеберцового нерва. А-волна достоверно чаще выявлялась у пациентов с положительными тестами на раздражение спинномозгового корешка. Снижение амплитуды или отсутствие Н-рефлекса чаще выявлялось у пациентов с отсутствием ахиллова рефлекса. Локализация А-волны перед F-волной – характерная особенность при этой патологии. Пациенты с наличием А-волны имели более выраженные изменения длительности и латентности F-волны как на поврежденной, так и неповрежденной стороне. Таким образом, включение полученных результатов в клинические и нейро-

визуализационные данные может быть полезно не только для диагностики, скрининга и прогнозирования развития патологического процесса на корешковом S1 уровне, но и для изучения механизмов повреждения нервной ткани.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Fisher, M. A. Electrophysiology of radiculopathies / M. A. Fisher // *Clin. Neurophysiol.* – 2002. – Vol. 113, N 3. – P. 317–335. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(02\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(02)00018-4)
2. Panayiotopoulos, C. P. F-waves in clinical neurophysiology / C. P. Panayiotopoulos, E. Chroni // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* – 1996. – Vol. 101, N 5. – P. 365–374. [https://doi.org/10.1016/0924-980X\(96\)95635-0](https://doi.org/10.1016/0924-980X(96)95635-0)
3. Mauricio, E. A. Utility of minimum F-wave latencies compared with F-estimates and absolute reference values in S1 radiculopathies: are they still needed? / E. A. Mauricio, E. L. Dimberg, D. I. Rubin // *Muscle Nerve.* – 2014. – Vol. 49, N 6. – P. 809–813. <https://doi.org/10.1002/mus.23992>
4. Nerve conduction studies in patients with lumbosacral radiculopathy caused by lumbar intervertebral disc herniation / S. Yousif [et al.] // *Adv. Orthop.* – 2020. – Vol. 2020. – Art. ID 8882387. <https://doi.org/10.1155/2020/8882387>
5. Ходулев, В. И. Клиническая и электронейромиографическая характеристика пациентов с изолированной радикулопатией S1 / В. И. Ходулев, О. В. Кобылко, А. А. Ковалев // *Мед. новости.* – 2023. – Т. 347, № 8. – С. 54–57.
6. Various aspects of F-wave values in a healthy population / J. A. M. Nobrega [et al.] // *Clin. Neurophysiol.* – 2004. – Vol. 115, N 10. – P. 2336–2342. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2004.05.011>
7. F-waves of peroneal and tibial nerves in the differential diagnosis and follow-up evaluation of L5 and S1 radiculopathies / C. Zheng [et al.] // *Eur. Spine J.* – 2018. – Vol. 27, N 8. – P. 1734–1743. <https://doi.org/10.1007/s00586-018-5650-9>
8. Toyokura, M. F wave duration in mild S1 radiculopathy / M. Toyokura, T. Furukawa // *Clin. Neurophysiol.* – 2002. – Vol. 113, N 8. – P. 1231–1235. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(02\)00148-7](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(02)00148-7)
9. Puksa, L. Occurrence of A-waves in F-wave studies of healthy nerves / L. Puksa, E. Stålberg, B. Falck // *Muscle Nerve.* – 2003. – Vol. 28, N 5. – P. 626–629. <https://doi.org/10.1002/mus.10448>
10. A retrospective study of the characteristics and clinical significance of A-waves in amyotrophic lateral sclerosis / J. Fang [et al.] // *Front Neurol.* – 2017. – Vol. 8. – Art. 515. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00515>
11. Significance of A-waves recorded in routine motor nerve conduction studies / C. Bischoff [et al.] // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* – 1996. – Vol. 101, N 6. – P. 528–533. [https://doi.org/10.1016/S0921-884X\(96\)96553-4](https://doi.org/10.1016/S0921-884X(96)96553-4)
12. A-waves increase the risk of developing neuropathy / I. Srotova [et al.] // *Brain Behav.* – 2017. – Vol. 7, N 8. – P. e00760. <https://doi.org/10.1002/brb3.760>
13. Magistris, M. R. Motor axon reflex and indirect double discharge: ephaptic transmission? A reappraisal / M. R. Magistris, G. Roth // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* – 1992. – Vol. 85, N 2. – P. 124–130. [https://doi.org/10.1016/0168-5597\(92\)90078-P](https://doi.org/10.1016/0168-5597(92)90078-P)
14. Further insight on A-wave in acute and chronic demyelinating neuropathies / F. Sartucci [et al.] // *Neurol. Sci.* – 2010. – Vol. 31, N 5. – P. 609–616. <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0354-x>
15. Khodulev, V. A-wave as a sign of peripheral nervous system demyelination / V. Khodulev, G. Ovsiankina, G. Zobnina // *Eur. J. Neurol.* – 1998. – Vol. 5, suppl. 3. – P. S46. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.1998.tb00464.x>
16. Khodulev, V. Significance of A-waves in isolated calf pain as a manifestation of radicular pain during F-wave studies: a case report / V. Khodulev, A. Kabyłka, A. Klimko // *Cureus.* – 2023. – Vol. 15, N 2. – P. e35254. <https://doi.org/10.7759/cureus.35254>
17. Rowin, J. Electrodiagnostic significance of supramaximally stimulated A-waves / J. Rowin, M. N. Meriggioli // *Muscle Nerve.* – 2000. – Vol. 23, N 7. – P. 1117–1120. [https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200007\)23:7<1117::AID-MUS16>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200007)23:7<1117::AID-MUS16>3.0.CO;2-#)
18. A waves in electroneurography: differential diagnosis with other late responses / L. Rampello [et al.] // *Neurol. Sci.* – 2020. – Vol. 41, N 12. – P. 3537–3545. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04649-2>
19. Diagnostic value of electrophysiological tests in patients with sciatica / M. J. Albeck [et al.] // *Acta Neurol. Scand.* – 2000. – Vol. 101, N 4. – P. 249–254. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2000.09005.x>
20. Ходулев, В. И. Объединенная длительность составной популяции F-волны – новый электронейромиографический параметр при исследовании радикулопатий / В. И. Ходулев, О. В. Кобылко // *Клиническая нейрофизиология и нейрореабилитация: материалы Восьмой науч.-практ. конф. с междунар. участием, СПб., 12–13 нояб. 2020 г. / ред.: В. Б. Войтенков, Н. В. Скрипченко.* – СПб., 2020. – С. 132–133.
21. Espiritu, M. G. Motoneuron excitability and the F wave / M. G. Espiritu, C. S.-Y. Lin, D. Burke // *Muscle Nerve.* – 2003. – Vol. 27, N 6. – P. 720–727. <https://doi.org/10.1002/mus.10388>

References

1. Fisher M. A. Electrophysiology of radiculopathies. *Clinical Neurophysiology*, 2002, vol. 113, no. 3, pp. 317–335. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(02\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(02)00018-4)
2. Panayiotopoulos C. P., Chroni E. F-waves in clinical neurophysiology. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1996, vol. 101, no. 5, pp. 365–374. [https://doi.org/10.1016/0924-980X\(96\)95635-0](https://doi.org/10.1016/0924-980X(96)95635-0)
3. Mauricio E. A., Dimberg E. L., Rubin D. I. Utility of minimum F-wave latencies compared with F-estimates and absolute reference values in S1 radiculopathies: are they still needed? *Muscle and Nerve*, 2014, vol. 49, no. 6, pp. 809–813. <https://doi.org/10.1002/mus.23992>

4. Yousif S., Ahmed A., Abdelhai A., Musa A. Nerve conduction studies in patients with lumbosacral radiculopathy caused by lumbar intervertebral disc herniation. *Advances in Orthopedics*, 2020, vol. 2020, art. ID 8882387. <https://doi.org/10.1155/2020/8882387>
5. Khodulev V. I., Kobylko O. V., Kovalev A. A. Clinical and electroneuromyographic characteristics of patients with isolated S1 radiculopathy. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2023, vol. 347, no. 8, pp. 54–57 (in Russian).
6. Nobrega J. A. M., Pinheiro D. S., Manzano G. M., Kimura J. Various aspects of F-wave values in a healthy population. *Clinical Neurophysiology*, 2004, vol. 115, no. 10, pp. 2336–2342. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2004.05.011>
7. Zheng C., Liang J., Nie C., Yu Z., Feizhou L., Jianyuan J. F-waves of peroneal and tibial nerves in the differential diagnosis and follow-up evaluation of L5 and S1 radiculopathies. *European Spine Journal*, 2018, vol. 27, no. 8, pp. 1734–1743. <https://doi.org/10.1007/s00586-018-5650-9>
8. Toyokura M., Furukawa T. F wave duration in mild S1 radiculopathy. *Clinical Neurophysiology*, 2002, vol. 113, no. 8, pp. 1231–1235. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(02\)00148-7](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(02)00148-7)
9. Puksa L., Stålberg E., Falck B. Occurrence of A-waves in F-wave studies of healthy nerves. *Muscle and Nerve*, 2003, vol. 28, no. 5, pp. 626–629. <https://doi.org/10.1002/mus.10448>
10. Fang J., Cui L., Liu M., Guan Y., Ding Q., Shen D., Li D., Tai H. A retrospective study of the characteristics and clinical significance of A-waves in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 2017, vol. 8, art. 515. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00515>
11. Bischoff C., Stålberg E., Falck B., Puska L. Significance of A-waves recorded in routine motor nerve conduction studies. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1996, vol. 101, no. 6, pp. 528–533. [https://doi.org/10.1016/S0921-884X\(96\)96553-4](https://doi.org/10.1016/S0921-884X(96)96553-4)
12. Srotova I., Vlckova E., Dusek L., Bednarik J. A-waves increase the risk of developing neuropathy. *Brain and Behavior*, 2017, vol. 7, no. 8, p. e00760. <https://doi.org/10.1002/brb3.760>
13. Magistris M. R., Roth G. Motor axon reflex and indirect double discharge: ephaptic transmission? A reappraisal. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1992, vol. 85, no. 2, pp. 124–130. [https://doi.org/10.1016/0168-5597\(92\)90078-P](https://doi.org/10.1016/0168-5597(92)90078-P)
14. Sartucci F., Bocci T., Borghetti D., Orlandi G., Manfredonia F., Murri L., Giannini F., Rossi A. Further insight on A-wave in acute and chronic demyelinating neuropathies. *Neurological Sciences*, 2010, vol. 31, no. 5, pp. 609–616. <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0354-x>
15. Khodulev V., Ovsiankina G., Zobnina G. A-wave as a sign of peripheral nervous system demyelination. *European Journal of Neurology*, 1998, vol. 5, suppl. 3, p. S46. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.1998.tb00464.x>
16. Khodulev V., Kabyłka A., Klimko A. Significance of A-waves in isolated calf pain as a manifestation of radicular pain during F-wave studies: a case report. *Cureus*, 2023, vol. 15, no. 2, p. e35254. <https://doi.org/10.7759/cureus.35254>
17. Rowin J., Meriggioli M. N. Electrodiagnostic significance of supramaximally stimulated A-waves. *Muscle and Nerve*, 2000, vol. 23, no. 7, pp. 1117–1120. [https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200007\)23:7<1117::AID-MUS16>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200007)23:7<1117::AID-MUS16>3.0.CO;2-#)
18. Rampello L., Rampello L., Arcidiacono A., Patti F. A waves in electroneurography: differential diagnosis with other late responses. *Neurological Sciences*, 2020, vol. 41, no. 12, pp. 3537–3545. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04649-2>
19. Albeck M. J., Taher G., Lauritzen M., Trojaborg W. Diagnostic value of electrophysiological tests in patients with sciatica. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2000, vol. 101, no. 4, pp. 249–254. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2000.09005.x>
20. Khodulev V. I., Kobylko O. V. The combined duration of the composite F-wave population is a new electroneuromyographic parameter in the study of radiculopathies. *Klinicheskaya neirofiziologiya i neiroreabilitatsiya: materialy Vos'moi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, Sankt-Peterburg, 12–13 noyabrya 2020 goda* [Clinical neurophysiology and neurorehabilitation: Proceedings of the Eighth scientific and practical conference with international participation, St. Petersburg, November 12–13, 2020]. St. Petersburg, 2020, pp. 132–133 (in Russian).
21. Espiritu M. G., Lin C. S.-Y., Burke D. Motoneuron excitability and the F wave. *Muscle and Nerve*, 2003, vol. 27, no. 6, pp. 720–727. <https://doi.org/10.1002/mus.10388>

Информация об авторах

Ходулев Василий Иосифович – д-р мед. наук, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Скорины, 24, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-0427-0601>. E-mail: khodulev@tut.by

Кобылко Олег Викторович – врач-невролог. Гомельская областная клиническая больница (ул. Братьев Лизюковых, 5, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: kobyлко-ol@mail.ru

Ковалев Алексей Алексеевич – ст. преподаватель. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: kovalev.data.analysis.gsmu@yandex.by

Information about the authors

Vasily I. Khodulev – D. Sc. (Med.), Head of the Department. Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery (24, F. Skoriny, 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-0427-0601>. E-mail: khodulev@tut.by

Aleh V. Kabyłka – neurologist. Gomel Regional Clinical Hospital (5, Brothers Lizyukov Str., Gomel, Republic of Belarus). E-mail: kobyлко-ol@mail.ru

Aleksey A. Kovalev – Senior Lecturer. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: kovalev.data.analysis.gsmu@yandex.by

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.314-089.843

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-326-333>

Поступила в редакцию 21.05.2024

Received 21.05.2024

Т. Л. Шевела, С. А. Костюк, М. Г. Белый

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА ПОДГОТОВКИ КОСТНОГО ЛОЖА ПРИ НЕПОСРЕДСТВЕННОЙ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Аннотация. Несмотря на достигнутые успехи в дентальной имплантации, актуальными остаются проблемы снижения числа осложнений после установки имплантатов и увеличения сроков их службы. Известно, что воспалительные осложнения, возникшие после внутрикостной дентальной имплантации, являются серьезным отягчающим фактором, влияющим на устойчивость и сохранность имплантата, что создает неблагоприятные условия для дальнейшего ортопедического лечения.

Цель работы – провести сравнительный анализ эффективности разных методов обработки зубной альвеолы на основании молекулярно-генетического микробиологического исследования.

Методы исследования: клинические, молекулярно-генетические, микробиологические.

В работе проведен сравнительный анализ эффективности разных методов обработки зубной альвеолы на основании результатов молекулярно-генетического микробиологического исследования. Представленные результаты исследования позволяют определить, что обработка зубной альвеолы является обязательным этапом санации операционной зоны. Методами выбора обработки зубных альвеол могут быть: механический – с применением шаровидного бора и физиодиспенсера, пьезохирургический – с использованием шаровидной насадки с алмазным покрытием.

Ключевые слова: непосредственная дентальная имплантация, зубная альвеола, микрофлора, физиодиспенсер, пьезохирургический метод

Для цитирования: Шевела, Т. Л. Обоснование выбора метода подготовки костного ложа при непосредственной дентальной имплантации / Т. Л. Шевела, С. А. Костюк, М. Г. Белый // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2024. – Т. 21, № 4. – С. 326–333. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-326-333>

Tatsiana L. Shevela, Svetlana A. Kostiuk, Maxim G. Bely

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

JUSTIFYING THE METHOD CHOSEN FOR BONE BED PREPARATION FOR IMMEDIATE DENTAL IMPLANTATION

Abstract. Despite the progress achieved in dental implantation, the problems of reducing the number of complications after implants placement and increasing their service life remain relevant. It is known that inflammatory complications that arise after intraosseous dental implantation serve as a serious aggravating factor affecting the stability and safety of the implant, which creates unfavorable conditions for further prosthodontics.

The aim of the study is to conduct a comparative analysis of the different-method effectiveness of dental alveoli preparation based on molecular-genetic microbiological research.

Research methods: clinical, molecular genetic, microbiological.

A comparative analysis of the different-method effectiveness of dental alveoli preparation based on the results of a molecular genetic microbiological study is presented in the research. A mandatory stage of sanitation of the operating area is found by the presented research results. The mechanical method using a spherical bur and a physiodispenser, the piezosurgical method using a spherical nozzle with a diamond coating can be a method of choice for dental alveoli preparation.

Keywords: immediate dental implantation, dental alveolus, microflora, physiodispenser, piezosurgical method

For citation: Shevela T. L., Kostiuk S. A., Bely M. G. Justifying the method chosen for bone bed preparation for immediate dental implantation. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 4, pp. 326–333 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-326-333>

Введение. Важным направлением в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии является изучение вопросов, связанных с медицинской реабилитацией пациентов. Санация полости рта, включая непосредственную дентальную имплантацию с немедленной нагрузкой, имеет свои преимущества, но при этом сопряжена с определенным риском. В настоящее

время данный метод является популярным, поскольку одноэтапный хирургический протокол позволяет восстановить жевательную функцию и достичь эстетического результата у пациента в минимальные сроки. В то же время восстановительные процессы при использовании данного метода, к сожалению, сопровождаются развитием воспалительно-деструктивных осложнений в костной ткани, окружающей дентальный имплантат [1]. Спорным остается и вопрос о возможности непосредственной дентальной имплантации после удаления зубов с наличием очагов хронической одонтогенной инфекции [1]. По данным Ю. Л. Денисовой (2018), распространенность эндопериодонтальных поражений у пациентов с болезнями периодонта составляет 68,6–94,6 % [2].

Немедленная имплантация показана при травме зуба, хроническом периодонтите, разрушении коронки и корня зуба, маргинальном периодонтите II и III степени с атрофией кости по вертикали, когда большая часть вестибулярной стенки кортикальной пластинки сохранилась (имплантация возможна только после завершения роста кости в возрасте старше 18 лет). Следует отметить, что хронический патологический процесс в области верхушки корня зуба не следует безоговорочно считать противопоказанием, именно в таких случаях показана хирургическая и медикаментозная обработка зубной альвеолы. Успех в данном случае зависит от качества обработки костного ложа для дентального имплантата, инстилляцией растворами антисептика и назначенной антибактериальной терапии за сутки до операции [3].

Этапы операции включают удаление зуба с тщательной синдесмотомией и последующей обработкой костной раны. При ревизии альвеолы проводят выскабливание тканей или активный кюретаж, удаление вросшей слизистой оболочки, инстилляцию антисептиком или установку в зубной альвеоле тампона, пропитанного антибиотиком, далее – остеотомию и установку имплантата. Однако ряд авторов отмечают высокую частоту (до 20,0 %) осложнений после непосредственной имплантации в альвеолы зубов с хроническими очагами одонтогенной инфекции.

Результаты научных и клинических исследований стали основанием для разработки новых методов непосредственной имплантации с немедленной нагрузкой, получивших медико-биологическое обоснование. Преимуществами такой имплантации в настоящее время считаются:

- сохранение объема и архитектоники кости в зоне удаленных зубов (сохраняется 60,0–90,0 % объема костной ткани альвеолярного отростка, в то время как без имплантации, после удаления зуба, вследствие резорбции и атрофии костной ткани через 12 мес. высота альвеолярного отростка снижается на 3,0–7,0 мм и составляет примерно 40,0–50,0 % от прежнего объема);

- сохранение контура альвеолярной кости и создание предпосылок для достижения эстетического результата лечения;

- сведение к минимуму количества операций и, как следствие, минимизация как травматического воздействия на ткани, так и негативного психологического фона для пациентов;

- существенное, как минимум на 3–6 мес., сокращение сроков лечения [4].

Таким образом, актуальной является непосредственная имплантация с немедленной нагрузкой. В зубной альвеоле после удаления зуба процессы регенерации костной ткани происходят более активно, чем после установки имплантата в сформированную кость, из-за значительных изменений в структуре кости челюсти. Установка имплантата в альвеолу сразу после удаления зуба считается предпочтительней, чем его установка через несколько месяцев, так как кортикальная кость сохраняет свои плотность и объем. При этом важно провести кюретаж и инстилляцию антисептиками зубной альвеолы с целью удаления патологических тканей, грануляций, микроорганизмов [5]. Заживление зубной альвеолы и приживание имплантата происходит одновременно, в связи чем уменьшается объем оперативных вмешательств и сокращаются сроки лечения, а кроме того, установленный в лунку имплантат предотвращает сужение альвеолы.

Несмотря на достигнутые успехи в дентальной имплантации, актуальными остаются проблемы снижения числа осложнений после установки имплантатов и увеличения сроков их службы. Известно, что воспалительные осложнения, возникшие после внутрикостной дентальной имплантации, служат серьезным отягощающим фактором, влияющим на устойчивость и сохранность имплантата, что создает неблагоприятные условия для дальнейшего ортопедического лечения.

Таким образом, важная роль в исследованиях отводится вопросам снижения воспалительно-инфекционных осложнений и оптимизации процессов остеоинтеграции при непосредственной дентальной имплантации после удаления зубов с периапикальными очагами инфекции [6].

Цель работы – провести сравнительный анализ эффективности разных методов обработки зубной альвеолы на основании молекулярно-генетического микробиологического исследования.

Материалы и методы исследования. Под наблюдением находилось 90 пациентов (62 женщины, 28 мужчин) с частичной вторичной адентией, которым проводилось удаление зубов с одновременной установкой дентальных имплантатов. Средний возраст мужчин составил 49,5 года, женщин – 45,6 года.

С целью получения данных о составе микробной флоры в зубной альвеоле проведены молекулярно-генетические микробиологические исследования.

При удалении зуба производили забор содержимого зубной альвеолы. Для этого использовали одноразовую иглу диаметром 1,25 мм и одноразовый шприц объемом 2 мл. Иглу погружали в зубную альвеолу и проводили аспирацию содержимого, после чего полученный биологический материал помещали в эппендорф с транспортной средой для дальнейшего проведения исследований с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР). Повторный забор содержимого производили после кюретажа и механической обработки зубной альвеолы с применением стоматологических инструментов, после чего биологический материал также помещали в пробирку с транспортной средой для проведения последующей лабораторной диагностики.

Для проведения исследования пациенты были разделены на группы:

группа сравнения (30 пациентов) – забор материала из зубной альвеолы производили непосредственно после удаления зуба;

основная группа 1 (30 пациентов) – после удаления зуба зубную альвеолу обрабатывали ручным методом с применением кюретажной ложки с последующей инстилляцией антисептиком – 0,05%-м водным раствором хлоргексидина биглюконата;

основная группа 2 (30 пациентов) – зубную альвеолу обрабатывали механическим методом, при этом:

у 14 пациентов зубные альвеолы обрабатывали с помощью кюретажной ложки с инстилляцией антисептиком (0,05%-й водный раствор хлоргексидина биглюконата), шаровидного бора и физиодиспенсера (в режиме: скорость 450 оборотов/мин, усилие 25 Н/см²), а затем обрабатывали стерильным раствором 0,9%-го хлорида натрия;

у 16 пациентов зубные альвеолы обрабатывали шаровидной насадкой с алмазным покрытием с применением пьезохирургического аппарата (пъезотома) и инстилляцией альвеолы 0,9%-м изотоническим раствором хлорида натрия.

Эффективность обработки стенок и дна зубных альвеол от грануляций, остатков эпителиальной ткани, хронических очагов одонтогенной инфекции оценивали с помощью бинокулярной оптики.

Для получения данных о качественном и количественном составе микробной флоры в динамике использовали молекулярно-генетический метод – ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из образцов биологического материала, основанное на принципе связывания нуклеиновых кислот с силикатными сорбентами в присутствии хаотропных солей, и их последующую элюцию в низкосолевого буфера проводили с помощью набора реагентов «АртДНК MiniSpin» («АртБиоТех», Беларусь).

Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, ThermoScientific), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280}).

Исследование биологического материала по выявлению ДНК возбудителей методом ПЦР в режиме реального времени включало:

№ 1 (количественные исследования) – выявление ДНК аэробных условно-патогенных возбудителей: *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.

№ 2 (качественные исследования) – дифференциальную подвидовую диагностику ДНК аэробных условно-патогенных возбудителей: *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pro-*

teus spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosae*, *Enterococcus faecalis* (*E. faecium*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp.

№ 3 (количественные исследования) – выявление ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулононегативных *Staphylococcus* spp.

№ 4 (количественные исследования) – выявление ДНК периодонтопатогенных возбудителей: *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyrromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*.

ПЦР-исследования по выявлению и количественному определению ДНК условно-патогенной флоры аэробной этиологии рода *Staphylococcus* spp., рода *Streptococcus* spp. и семейства Enterobacteriaceae проводили с применением набора реагентов «АмплиПрайм Флороскрин-Аэробы» («АмплиПрайм», Россия). Набор реагентов «АмплиСенс MRSA-скрин-титр-FL» («АмплиСенс», Россия) использовали для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* и метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. Качественное выявление и дифференциальную диагностику семейства Enterobacteriaceae (выявление ДНК *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Enterococcus faecalis/faecium*), а также *Pseudomonas aeruginosa* проводили с использованием набора реагентов «Септоскрин» («Литех», Россия). Амплификацию осуществляли на термоциклере Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия).

ДНК *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus pyogenes* определяли согласно инструкции Министерства здравоохранения Республики Беларусь по применению нового метода исследования № 034-0418 «Метод выявления условно-патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* и их повидовая идентификация».

Выявление ДНК *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyrromonas gingivalis*, *Porphyrromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* в количественном формате с определением концентраций возбудителей проводили с использованием тест-системы «Дентоскрин» («ООО НПФ Литех», Россия).

При проведении качественных исследований результаты интерпретировали, учитывая наличие (или отсутствие) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема кривой, что определяло наличие (или отсутствие) для искомой ДНК-мишени значения порогового цикла Ct на основании стандартной таблицы. При проведении количественных исследований определяли концентрации ДНК искомых возбудителей относительно входящих в состав тест-систем стандартов [7].

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы STATISTICA 10.0. При уровне значимости $p < 0,05$ различия считали статистически достоверными. Для описания частот выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения.

Результаты и их обсуждение. Результаты проведенного молекулярно-биологического исследования представлены в таблице.

В группе сравнения непосредственно после удаления зуба в зубных альвеолах выявлена аэробная условно-патогенная микрофлора: ДНК Enterobacteriaceae – у 100,0 % пациентов ($n = 30$), *Staphylococcus* spp. – у 73,3 % ($n = 30$), *Streptococcus* spp. – у 73,3 % ($n = 30$), *Escherichia coli* – у 46,6 % ($n = 30$), *Enterobacter* spp. – у 30,0 % ($n = 30$), *Klebsiella* spp. – у 1,0 % ($n = 30$), *Enterococcus faecalis/E. faecium* – у 3,0 % пациентов ($n = 30$), *Proteus* spp., *Serratia* spp. и *Pseudomonas aeruginosae* не обнаружены. Высокий титр ДНК (более $1,0 \cdot 10^4$ ГЭ/мл) обнаружен в данной группе в 50,0 % случаев при преимущественном выявлении ДНК *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus epidermidis*.

Периодонтопатогенная микрофлора представлена следующим составом: *Prevotella intermedia* – у 3,3 % пациентов ($n = 30$), *Treponema denticola* – у 56,6 % ($n = 30$), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – у 3,33 % ($n = 30$), *Porphyrromonas gingivalis* – у 76,6 % ($n = 30$), *Tannerella forsythia* – у 50,0 % пациентов ($n = 30$).

Анализ видового, количественного и качественного исследования зубной альвеолы на наличие ДНК микроорганизмов у пациентов ($n = 90$) в зависимости от метода обработки зубной альвеолы
Analysis of species, quantitative and qualitative research of dental alveoli for the presence of microorganism DNA in patients ($n = 90$) depending on the method of dental alveolus treatment

Вид микроорганизмов	Группа сравнения ($n = 30$)	Группа 1 (кюретаж) ($n = 30$)	Группа 2 (механический метод) ($n = 30$)
Количественные исследования – выявление ДНК аэробных условно-патогенных микроорганизмов			
Enterobacteriaceae	30 (100,0 %)	30 (100,0 %)	5 (16,6 %)
<i>Staphylococcus</i> spp.	23 (73,3 %)	17 (56,6 %)	9 (30,0 %)
<i>Streptococcus</i> spp.	23 (73,3 %)	19 (63,3 %)	10 (33,3 %)
Качественные исследования – дифференциальная повидовая диагностика ДНК аэробных условно-патогенных возбудителей			
ДНК <i>Escherichia coli</i>	14 (46,6 %)	12 (40,0 %)	1 (3,3 %)
ДНК <i>Enterobacter</i> spp.	9 (30,0 %)	9 (30,0 %)	1 (3,3 %)
ДНК <i>Klebsiella</i> spp.	1 (3,3 %)	1 (3,3 %)	1 (3,3 %)
ДНК <i>Proteus</i> spp.	–	–	–
ДНК <i>Serratia</i> spp.	–	–	–
ДНК <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–
ДНК <i>Enterococcus faecalis/faecium</i>	3 (10,0 %)	3 (10,0 %)	–
ДНК <i>Staphylococcus aureus</i>	15 (50,0 %)	12 (40,0 %)	5 (16,6 %)
ДНК <i>Staphylococcus epidermidis</i>	5 (16,6 %)	5 (16,6 %)	5 (16,6 %)
ДНК <i>Streptococcus epidermidis</i>	16 (53,3 %)	16 (53,3 %)	2 (6,6 %)
Количественные исследования – выявление ДНК периодонтопатогенных возбудителей (копий/мл)			
ДНК <i>Prevotella intermedia</i>	1 (3,3 %)	1 (3,3 %)	1 (3,3 %)
ДНК <i>Tannerella forsythia</i>	15 (50,0 %)	10 (33,3 %)	7 (23,3 %)
ДНК <i>Treponema denticola</i>	17 (56,6 %)	15 (50,0 %)	9 (30,0 %)
ДНК <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1 (3,3 %)	–	–
ДНК <i>Porphyromonas gingivalis</i>	23 (76,6 %)	15 (50,0 %)	14 (46,6 %)

В 16 образцах биологического материала пациентов группы сравнения выявленные возбудители присутствовали в составе полимикробной инфекции: ДНК *Staphylococcus* spp. + *Streptococcus* spp. – в 8 (26,6 %) образцах, ДНК *Staphylococcus* spp. + Enterobacteriaceae – в 11 (36,6 %) образцах, что дает основание предполагать, что они формируют биологические сообщества в виде биопленок, а значит, обладают уникальной способностью минимизировать влияние защитных факторов организма человека.

В группе 1 после обработки зубной альвеолы ручным инструментом и проведения хирургического кюретажа выявлено преимущественное присутствие условно-патогенных микроорганизмов. При количественном исследовании остается высоким ($\leq 1,0 \cdot 10^4$ ГЭ/мл) содержание ДНК аэробной условно-патогенной микрофлоры: ДНК Enterobacteriaceae – у 100,0 % пациентов ($n = 30$), *Staphylococcus* spp. – у 56,6 %, *Streptococcus* spp. – у 73,3 % пациентов ($n = 30$).

После проведения стоматологических манипуляций качественные исследования ДНК аэробных условно-патогенных возбудителей демонстрировали незначительное (на 40,0 %) снижение присутствия ДНК *Escherichia coli* и ДНК *Staphylococcus aureus*. Остальной видовой состав микрофлоры не изменялся.

На следующем этапе нами проведены исследования по определению количественных уровней (концентраций) ДНК микроорганизмов условно-патогенной флоры аэробной этиологии в образцах из зубной альвеолы. Установлено, что у пациентов основной группы 1 и группы сравнения количественные уровни ДНК условно-патогенных микроорганизмов не имели статистически

значимых различий ($p \geq 0,005$). При этом концентрация (Me (Q_{25} – Q_{75})) ДНК *Staphylococcus* spp. составила $6,35 (4,41/9,07) \cdot 10^5$ копий/мл, в том числе: MSSA – $7,29 (5,19/9,30) \cdot 10^3$ копий/мл, MRSA – $7,51 (5,37/9,28) \cdot 10^3$, MRCoNS – $8,56 (6,42/9,95) \cdot 10^3$, ДНК *Streptococcus* spp. – $5,89 (3,42/8,25) \cdot 10^5$, ДНК Enterobacteriaceae – $5,16 (2,91/7,22) \cdot 10^4$ копий/мл.

Количественное исследование периодонтопатогенной микрофлоры в зубной альвеоле показало значительное уменьшение концентраций ДНК условно-патогенных микроорганизмов ($p \leq 0,05$) в основной группе 1 пациентов: *Treponema denticola* – у 50,0 % пациентов ($n = 30$), *Porphyromonas gingivalis* – у 50,0 % ($n = 30$), *Tannerella forsythia* – у 33,3 % пациентов ($n = 30$).

В группе 2 отсутствовали достоверные различия ($p \geq 0,05$) в значениях концентрации ДНК условно-патогенной микрофлоры до обработки, тогда как после обработки зубной альвеолы шаровидным бором, физиодиспенсером (в режиме: скорость 450 об/мин, усилие 25 Н/см²) и шаровидной насадкой с алмазным покрытием с применением пьезохирургического аппарата (пъезотома) у пациентов этой группы снижение содержания ДНК аэробной условно-патогенной и периодонтопатогенной микрофлоры достоверно отличалось от такового в группе сравнения ($p \leq 0,05$) и в основной группе 1 ($p \leq 0,05$).

Обнаружение ДНК Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. в группе 2 снизилось на 50,0 %, повидовое выявление ДНК аэробных условно-патогенных возбудителей при проведении качественных ПЦР-исследований снизилось в 3,3 раза, что было достоверно значимо ($p \leq 0,05$).

Во 2-й группе количественное исследование периодонтопатогенной микрофлоры в зубной альвеоле показало достоверное уменьшение ($p \leq 0,05$) в детекции микроорганизмов: *Treponema denticola* – у 30,0 % пациентов ($n = 30$), *Porphyromonas gingivalis* – у 46,6 % ($n = 30$), *Tannerella forsythia* – у 23,3 % пациентов ($n = 30$).

Согласно современным представлениям, наиболее значимыми в этиологии и патогенезе воспалительных осложнений, возникающих в процессе и после установки дентальных имплантатов, являются две группы факторов: 1) патогенное действие микрофлоры, в том числе зубного налета (биопленки); 2) нарушение общей и местной иммунной защиты полости рта, в норме направленной на устранение патогенного воздействия на периимплантатные ткани микроорганизмов и токсических продуктов их жизнедеятельности. Однако большинство стоматологов сегодня уверены в том, что ключевым звеном в патогенезе осложнений при дентальной имплантации являются микроорганизмы. Известно, что полость рта представляет своеобразную экологическую систему, имеющую тесные связи с внешним окружением и внутренней средой организма. Установлено, что в полости рта обитают бактерии, простейшие и грибы, которые находятся в постоянной взаимосвязи между собой и организмом.

Видовой состав микроорганизмов полости рта в норме характеризуется определенным уровнем стабильности между имеющимися штаммами, несмотря на регулярный обмен бактерий с окружающей средой, проводимые гигиенические мероприятия, изменение количества и качества ротовой жидкости. Выявленная закономерность обусловлена микробным антагонизмом с нестабилизируемой нормальной бактериальной флорой (лактобактериями, бифидобактериями *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus viridans* и др.), которая конкурирует с патогенными бактериями и грибами, блокируя их заселение и рост.

Увеличение количества микрофлоры и частоты ее выявления может сопровождаться увеличением концентрации вырабатываемых бактериями повреждающих веществ, превышающей защитные способности организма. К условно-патогенным микроорганизмам полости рта относятся стрептококки, стафилококки, энтерококки, грибы рода *Candida*. Данные микроорганизмы являются неспецифическими возбудителями инфекционно-воспалительного процесса в пародонтальных, а следовательно, и в периимплантных тканях. Состояние десневых тканей напрямую зависит от количества вырабатываемых этими бактериями токсинов, содержание которых увеличивается при увеличении площади колонизации участков слизистой оболочки полости рта [8].

В последнее время возникновение и развитие воспалительно-деструктивного процесса в периимплантатной зоне в отсроченном периоде после дентальной имплантации связывают с воздействием специфической периодонтальной инфекции, состоящей из 6–7 периодонтопатогенных

бактерий, оказывающих свой повреждающий эффект в любой комбинации. К специфическим периодонтотенным видам относят *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium necrophorum*, *Treponema denticola*, которые оказывают свой патогенный эффект на ткани пародонта, в том числе и на периимплантатные зоны. Агрессивные свойства бактерий вызывают воспалительные и деструктивные процессы в тканях непосредственно и опосредовано, при этом в организме запускается целый комплекс иммунологических механизмов [9, 10].

Вырабатываемые условно-патогенными и патогенными микроорганизмами периодонтальной экологической ниши лейкотриены, жирные кислоты, гидролитические ферменты, протеиназы, пародонтоаза, фосфолипазы оказывают разрушающее действие на все структуры пародонта, как тканевые, так и костные.

Многие условно-патогенные и патогенные бактерии, заселяющие периодонтальную экологическую нишу в большом количестве, способны разрушать иммуноглобулины своими ферментами, которые блокируют синтез и тем самым уменьшают выработку иммуноглобулинов основных классов (IgA, IgG, IgM). Это приводит к снижению биоцидной функции слизистой оболочки полости рта, что создает условия для проникновения в десневые ткани патогенной микрофлоры и токсических продуктов их жизнедеятельности [9, 10].

По нашему мнению, особое значение могут иметь конкретные условно-патогенные виды микроорганизмов, которые потенциально способны реализовать свои агрессивные свойства за счет повышенной продукции экзо- и эндотоксинов, протеолитических ферментов и факторов инвазии.

Для профилактики осложнений после проведения дентальной имплантации чаще всего использовали местные антисептические препараты, а также различные способы инструментального воздействия на условно-патогенную и патогенную микрофлору полости рта.

Таким образом, несмотря на имеющиеся в литературе данные по профилактике и специфическому лечению воспалительных осложнений, необходимо продолжать поиск новых технологических и медикаментозных методов, способных улучшить качество дентальной имплантации.

Заключение. Таким образом, проведение предоперационной подготовки зубных альвеол позволит снизить микробную контаминацию и удалить очаги хронической одонтогенной инфекции, а следовательно, предотвратить развитие инфекционно-воспалительных процессов в зоне установленного дентального имплантата. Представленные результаты исследования позволяют заключить, что подготовка костного ложа при непосредственной дентальной имплантации является обязательным этапом санации операционной зоны. Методами выбора обработки зубных альвеол могут быть: механический – с применением шаровидного бора и физиодиспенсера, пьезохирургический – с использованием шаровидной насадки с алмазным покрытием.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Гударьян, А. А. Особенности непосредственной имплантации при наличии хронических очагов одонтогенной инфекции / А. А. Гударьян, М. Г. Дробязго, А. Н. Шамрай // Мед. перспективы. – 2016. – Т. 21, № 4. – С. 84–91.
2. Клинические особенности эндопериодонтита у пациентов с болезнями пародонта / Ю. Л. Денисова [и др.] // Пародонтология. – 2018. – Т. 24, № 3. – С. 16–23.
3. Кулаков, А. А. Факторы, влияющие на остеоинтеграцию и применение ранней функциональной нагрузки для сокращения сроков лечения при дентальной имплантации / А. А. Кулаков, А. С. Каспаров, Д. А. Порфенчук // Стоматология. – 2019. – № 4. – С. 107–115.
4. Мохначева, С. Б. Существующие методики ведения лунки удаленного зуба для отсроченной установки дентального имплантата (обзор) / С. Б. Мохначева, Н. И. Васильев // Клини. стоматология. – 2022. – Т. 25, № 3. – С. 38–46.
5. Редько, Н. А. Презервация лунки зуба в предимплантационном периоде: оценка эффективности применения костнопластических материалов с использованием данных конусно-лучевой компьютерной томографии / Н. А. Редько, А. Ю. Дробышев, Д. А. Лежнев // Кубан. науч.-мед. вестн. – 2019. – № 6. – С. 70–79.
6. Волошина, А. А. Значение микробного фактора в развитии и течении воспалительных заболеваний пародонта // Молодой ученый. – 2011. – № 1. – С. 248–251.
7. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта / В. Н. Царев [и др.]; под ред. В. Н. Царева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 576 с.

8. Шевела, Т. Л. Видовой состав микробной флоры в операционной зоне костной ткани челюстей / Т. Л. Шевела, А. А. Рачков, С. А. Костюк // Вестн. фонда фундам. исслед. – 2018. – № 1. – С. 75–79.
9. Костюк, С. А. Молекулярно-биологические методы в медицине / С. А. Костюк; Белорус. мед. акад. последиплом. образования. – Минск: БелМАПО, 2013. – 326 с.
10. Жаворонок, С. В. Микрофлора полости рта и стоматологические заболевания / С. В. Жаворонок, Т. Л. Шевела, С. А. Костюк. – [London]: LAP LAMBERT, 2018. – 124 с.

References

1. Gudar'yan A. A., Drobyazgo M. G., Shamrai A. N. Features of direct implantation in the presence of chronic foci of odontogenic infection. *Medichni perspektivi* [Medical perspectives], 2016, vol. 21, no. 4, pp. 84–91 (in Russian).
2. Denisova Yu. L., Dedova L. N., Solomevich A. S., Rosenik N. I. Clinical features of endoperiodontitis in patients with periodontal diseases. *Parodontologiya* [Periodontics], 2018, vol. 24, no. 3, pp. 16–23 (in Russian).
3. Kulakov A. A., Kasparov A. S., Porfenchuk D. A. Factors influencing osseointegration and the use of early functional load to reduce treatment time during dental implantation. *Stomatologiya* [Dentistry], 2019, no. 4, pp. 107–115 (in Russian).
4. Mokhnacheva S. B., Vasil'ev N. I. Existing techniques for maintaining the socket of an extracted tooth for delayed installation of a dental implant (review). *Klinicheskaya stomatologiya* [Clinical dentistry], 2022, vol. 25, no. 3, pp. 38–46 (in Russian).
5. Red'ko N. A., Drobyshev A. Yu., Lezhnev D. A. Preservation of the tooth socket in the preimplantation period: assessment of the effectiveness of the use of osteoplastic materials using data from cone-beam computed tomography. *Kubanskii nauchnyi meditsinskii vestnik* [Kuban scientific and medical bulletin], 2019, no. 6, pp. 70–79 (in Russian).
6. Voloshina A. A. The importance of microbial factors in the development and course of inflammatory periodontal diseases. *Molodoi uchenyi* [Young scientist], 2011, no. 1, pp. 248–251 (in Russian).
7. Tsarev V. N., Davydova M. M., Nikolaeva E. N., Pokrovskii V. N., Pozharskaya V. O., Plakhtii L. Ya., Spirande I. V., Ushakov R. V., Ippolitov E. V. *Microbiology, virology and immunology of the oral cavity*. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2013. 576 p. (in Russian).
8. Shevela T. L., Rachkov A. A., Kostyuk S. A. Species composition of microbial flora in the surgical area of jaw bone tissue. *Vestnik fonda fundamental'nykh issledovaniy* [Bulletin of the foundation for basic research], 2018, no. 1, pp. 75–79 (in Russian).
9. Kostyuk S. A. *Molecular biological methods in medicine*. Minsk, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, 2013. 326 p. (in Russian).
10. Zhavoronok S. V., Shevela T. L., Kostyuk S. A. *Oral microflora and dental diseases*. London, LAP LAMBERT, 2018. 124 p. (in Russian).

Информация об авторах

Шевела Татьяна Леонидовна – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shevelatatyana@mail.ru

Костюк Светлана Андреевна – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: s.kostiuk@mail.ru

Белый Максим Григорьевич – аспирант. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: maximbely@gmail.com

Information about the authors

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

Svetlana A. Kostyuk – D. Sc. (Med.), Professor, Chief Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: s.kostiuk@mail.ru

Maxim G. Bely – Postgraduate Student. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: maximbely@gmail.com

А. А. Жабинская, Т. Б. Мелик-Касумов, А. Э. Пыж

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ КРЫС ЛИНИИ WISTAR ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ И ПРЕБИОТИКА 2'-ФУКОЗИЛЛАКТОЗЫ

Аннотация. Результаты многочисленных исследований, проведенных в последние десятилетия, показали, что кишечная микробиота может существенно влиять на организм хозяина. Активное развитие кишечной микробиоты в первые годы жизни происходит параллельно с развитием нервной, эндокринной и иммунной систем. Учитывая это, кишечный дисбиоз в раннем возрасте может привести к нарушению формирования регуляторных систем макроорганизма. В этих условиях пребиотики молока могут оказывать позитивный корректирующий эффект.

Цель настоящего исследования – изучить особенности развития антибиотик-ассоциированного дисбиоза в раннем постнатальном периоде у крыс и оценить влияние 2'-фукозиллактозы в норме и на фоне развития дисбиоза.

Исследование проводили на крысах линии Wistar в возрасте 12–26 сут. Для развития дисбиоза в раннем возрасте были использованы: смесь ампициллина тригидрата 75 мг/кг и метронидазола 50 мг/кг и смесь амоксициллина 30 мг/кг и цефалексина 20 мг/кг в течение 3 сут, начиная с 12-х суток жизни. В качестве пребиотика использовали 2'-фукозиллактозу в дозе 1 г/кг, начиная с 12-х суток до последнего дня эксперимента.

У контрольных крысят обнаружены возрастные изменения содержания бифидобактерий и энтерококков: к возрасту 26 сут отмечалось снижение их титра в кишечнике. Смесь ампициллина тригидрата 75 мг/кг и метронидазола 50 мг/кг оказывает сильный дисбиотический эффект, выражающийся в уменьшении титра бифидобактерий, лактобацилл и энтерококков кишечника. Однако через 5 сут после прекращения введения антибиотиков в период продолжающегося вскармливания молоком отмечается восстановление всех перечисленных показателей. Применение 2'-фукозиллактозы способствует сохранению титра *Bifidobacterium* spp. и *Enterococcus* spp., при этом данный пребиотический эффект сохраняется на фоне ранее перенесенного дисбиоза.

Полученные результаты указывают на то, что применение антибиотиков в раннем возрасте вызывает временные, но мощные дисбиотические изменения в толстом кишечнике. Вместе с тем применение 2'-фукозиллактозы приводит к сохранению важных пробиотических групп бактерий кишечника как в норме, так и после перенесенного дисбиоза.

Ключевые слова: кишечная микробиота, антибиотик-ассоциированный дисбиоз, 2'-фукозиллактоза, пребиотики, бифидобактерии

Для цитирования: Жабинская, А. А. Особенности возрастных изменений кишечной микробиоты крыс линии Wistar при действии антибиотиков и пребиотика 2'-фукозиллактозы / А. А. Жабинская, Т. Б. Мелик-Касумов, А. Э. Пыж // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2024. – Т. 21, № 4. – С. 334–344. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-334-344>

Alesia A. Zhabinskaya, Tigran B. Melik-Kasumov, Hanna E. Pyzh

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

AGE-RELATED FEATURES OF THE INTESTINAL MICROBIOTA CHANGES IN WISTAR RAT PUPS AFTER APPLICATION OF ANTIBIOTICS AND PREBIOTIC 2'-FUCOSYLLACTOSE

Abstract. The gut microbiota plays an important role in the formation of the body's regulatory systems (nervous, endocrine, immune), which is especially important at an early age. Hence, gut dysbiosis can lead to an impaired development of both the intestinal microbiota and these regulatory systems. Prebiotics can have a positive effect on the development of the intestinal microbiome, which can correct negative changes.

The aim of this study is to investigate the features of development of antibiotic-associated dysbiosis in the early postnatal period in rats and to evaluate the effect of 2'-fucosyllactose in health and during dysbiosis.

The study was conducted on Wistar rats aged 12–26 days. To develop dysbiosis at an early age, the following mixtures were used: a mixture of ampicillin trihydrate 75 mg/kg and metronidazole 50 mg/kg and a mixture of amoxicillin 30 mg/kg and cephalixin 20 mg/kg for three days, starting on the 12th day of life. As a prebiotic 2'-fucosyllactose at a dose of 1 g/kg was used, starting on the 12th day and to the last experiment day.

In healthy animals, there is a decrease in the gut content of *Bifidobacterium* spp. and *Enterococcus* spp. at the age of 26 days. A mixture of ampicillin trihydrate 75 mg/kg and metronidazole 50 mg/kg leads to gut dysbiosis – growth suppression of bifidobacteria, lactobacilli and enterococci. After the end of antibiotics application and continued lactation, the titer of the described bacteria is restored. 2'-fucosyllactose has an effect on the preservation of the titer of *Bifidobacterium* spp. and *Enterococcus* spp., both in healthy animals and after early dysbiosis.

Our results indicate that antibiotic-associated dysbiosis at an early age is characterized by a temporary but powerful effect. At the same time, the use of 2'-fucosyllactose leads to preserving important probiotic groups of intestinal bacteria, both in health and after dysbiosis.

Keywords: intestinal microbiota, antibiotic-associated dysbiosis, 2'-fucosyllactose, prebiotics, bifidobacteria

For citation: Zhabinskaya A. A., Melik-Kasumov T. B., Pyzh H. E. Age-related features of the intestinal microbiota changes in Wistar rat pups after application of antibiotics and prebiotic 2'-fucosyllactose. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 4, pp. 334–344 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-334-344>

Введение. Кишечная микробиота представляет собой симбиотическое сообщество, состоящее из бактерий, грибов, архей, вирусов и простейших, которые содержатся в желудочно-кишечном тракте [1–3]. Бактерии являются доминирующей группой в микробиоте [4]. Ввиду обилия видов микроорганизмов и их общей массы в кишечнике микробиота является важным фактором, определяющим функциональное состояние макроорганизма и его устойчивость к тем или иным заболеваниям [4, 5]. Микробиота кишечника человека активно изменяется в первые годы жизни и достигает устойчивого состава к четырем годам [6]. Важным процессом, который характеризует переход микробиоты ребенка к «взрослой» микробиоте, является снижение количества актинобактерий. В частности, отмечается снижение содержания одного из ключевых представителей класса – *Bifidobacterium* spp. [7]. Бактерии кишечника играют важную роль в производстве короткоцепочечных жирных кислот, синтезе витаминов, поддержании иммунной системы и кишечного барьера [4, 8, 9] и, в частности, в созревании иммунных клеток, что особенно важно в раннем возрасте. Нарушения во взаимодействии иммунных клеток с антигенами и метаболитами кишечной микробиоты могут приводить к различным заболеваниям во взрослом возрасте. В основе данного влияния лежат сложные механизмы, включающие регуляцию Т-клеток и баланс про- и противовоспалительных цитокинов в лимфоидной ткани кишечника [6].

Наиболее сильное негативное влияние на развивающуюся микробиоту оказывает применение антибиотиков, что часто приводит к развитию антибиотик-ассоциированного дисбиоза. Дисбиоз представляет собой стойкое изменение качественного и количественного состава кишечной микробиоты. Развитие дисбиоза в детском возрасте негативно влияет на растущий организм и может сказаться на развитии регуляторных систем организма – нервной, эндокринной, иммунной [6]. Кроме того, антибиотик-ассоциированный дисбиоз может иметь как краткосрочные, так и долгосрочные последствия [10]. В последнее время дисбиоз кишечника или менее выраженные изменения в составе микробиоты связывают с возникновением или прогрессированием различных неврологических расстройств, таких как рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера [11–13]. Отдельно стоит выделить такие неврологические заболевания, дебютирующие в детстве, как аутизм и детская эпилепсия [14, 15]. Для них также отмечено значимое изменение разнообразия и количества представителей кишечной микробиоты по сравнению с данными показателями у здоровых детей. Таким образом, изменения в кишечной микробиоте могут быть как следствием, так и фактором риска развития тех или иных заболеваний.

В связи с этим актуальным становится изучение подходов, позволяющих улучшить состояние кишечной микробиоты, особенно в детском возрасте. Одним из нутритивных подходов является применение пребиотиков. Пребиотики – это неперевариваемые пищевые компоненты, которые могут избирательно стимулировать рост и/или активность пробиотических групп бактерий в толстом кишечнике [16]. Большинство пребиотиков представляют собой углеводы различных групп. Среди них выделяют фруктаны (инулин и фруктоолигосахариды), галактоолигосахариды и полимеры глюкозы (резистентный крахмал, полидекстроза) [17]. Пребиотики увеличивают в кишечнике количество полезных бактерий, в частности родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Bacteroides* [4].

В последние годы возрос интерес к такой категории пребиотиков, как олигосахариды грудного молока (ОГМ). Грудное молоко содержит более 200 структурно различных олигосахаридов [18]. Компонентный состав ОГМ существенно отличается у разных организмов. Так, по сравнению с грудным молоком коровье молоко содержит в 50 раз меньше олигосахаридов, козье и овечье – в 500 раз меньше [19]. Вместе с тем молоко крыс наиболее близко к грудному по олигосахаридному составу, что позволяет использовать этих модельных животных в биомедицинских исследованиях по изучению развития микробиоты в детском возрасте [20]. Самым распространенным ОГМ является 2'-фукозиллактоза, ее доля среди других составляет до 30 %. ОГМ ферментируются преимущественно бифидобактериями, в частности *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium infantis*. Пробиотическая роль бифидобактерий хорошо известна: они синтезируют витамины группы В, усиливают кишечный барьер и проявляют прямой антагонизм к условно-патогенным микроорганизмам, в частности к *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens* [19].

Таким образом, ранний постнатальный период является ключевым в становлении баланса основных представителей кишечной микробиоты. В этот период развития параллельно с изменением состава кишечной микробиоты происходит формирование регуляторных систем организма – иммунной, нервной и эндокринной. В связи с этим существенное изменение кишечной микробиоты ввиду антибиотик-ассоциированного дисбиоза может сказаться на последующей реактивности макроорганизма и таким образом служить фактором риска для развития многих заболеваний.

Цель исследования – изучить особенности развития антибиотик-ассоциированного дисбиоза в раннем постнатальном периоде у крыс и оценить влияние 2'-фукозиллактозы в норме и на фоне развития дисбиоза.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на 105 крысах линии Wistar в возрасте 12–26 сут. На первом этапе исследования для моделирования антибиотик-ассоциированного дисбиоза сравнивали две смеси антибиотиков. В каждой группе крысята получали смесь антибиотиков или воду *per os* в течение 3 сут, начиная с 12-х суток. Животным первой группы давали смесь ампициллина тригидрата 75 мг/кг и метронидазола 50 мг/кг, крысятам второй группы – смесь амоксициллина 30 мг/кг и цефалексина 20 мг/кг. Антибиотики суспендировали в воде и вводили с помощью зонда внутрижелудочно. Животные контрольной группы получали аналогичный объем воды. В возрасте 15 сут после декапитации проводили забор кишечного содержимого.

На втором этапе исследования оценивали динамику изменения баланса представителей кишечной микробиоты у животных, которые подвергались различным воздействиям. В качестве негативного воздействия применяли смеси антибиотиков, в качестве позитивного – внутрижелудочное введение ОГМ пребиотика 2'-фукозиллактозы в дозе 1 г/кг, начиная с 12-х суток и до конца эксперимента. Контрольным животным вводили воду.

Забор проб кишечного содержимого проводили в возрасте 15, 19 и 26 сут в отдельных группах животных после их эвтаназии путем декапитации. Для забора проб кишечного содержимого вырезали часть кишечника от начала восходящей ободочной кишки до конца сигмовидной кишки и промывали его в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Массу полученного материала фиксировали как разницу между массой жидкости до и массой жидкости после промывания кишечника. Каждая экспериментальная группа включала 6–8 крысят, группа «контроль 15 сут» – 14 крысят.

Исследование состава микробиоты кишечника крысят проводили методом посева на дифференциальные диагностические среды (ФБУН «ГНЦ ПМиБ», Оболенск, РФ) с последующим подсчетом log КОЕ/г материала. Определяли титр микроорганизмов *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Candida* spp., *Escherichia coli*.

Эксперименты проведены с соблюдением законодательства, принципов биоэтики и согласно положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных исследований (Страсбург, 1986). Дизайн исследования и объем выборок одобрены комиссией по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 26.01.2023 г.).

Статистический анализ проводили в программе Statistica 10.0 с использованием критерия Краскела–Уоллиса и апостериорного критерия Данна для межгруппового сравнения. Для оценки связи между показателями использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные представляли в виде медианы и квартилей (Me (Q₁; Q₃)). Отличия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Сравнительные данные об изменении титра некоторых представителей кишечной микробиоты при действии различных смесей антибиотиков представлены в табл. 1.

Таблица 1. Изменение титра некоторых представителей кишечной микробиоты при применении различных смесей антибиотиков

Table 1. Titer change in some representatives of the intestinal microbiota when using various mixtures of antibiotics

Род кишечной микробиоты	Контроль	Смесь ампициллина тригидрата и метронидазола	Смесь амоксициллина и цефалексина
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,9 (7,9; 9,3)	0 (0; 3,0)*	5,9 (1,5; 7,8)*
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,9 (6,5; 7,3)	5,4 (4,9; 5,8)*	6,7 (5,3; 6,8)
<i>Enterococcus</i> spp.	6,3 (6,2; 6,5)	4,8 (4,6; 5,3)*	6,5 (6,4; 6,8)
<i>E. coli</i>	5,0 (0; 6,0)	5,8 (5,3; 6,0)	0 (0; 3,1)
<i>Candida</i> spp.	6,6 (6,5; 8,0)	4,3 (4,0; 5,0)*	5,4 (4,1; 6,2)*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

На первом этапе исследования установлено, что применение каждой из смесей антибиотиков вызывало снижение титра *Bifidobacterium* spp. В частности, применение смеси ампициллина тригидрата и метронидазола приводило к практически полной элиминации представителей данного рода пробиотических бактерий у большинства экспериментальных животных (71 %), что отражалось в значимом снижении медианного показателя по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0032$). Снижение титра *Bifidobacterium* spp. отмечалось также и в группе с применением смеси амоксициллина и цефалексина. Однако в этом случае крысы с полной элиминацией *Bifidobacterium* spp. составляли лишь 40 % от общего числа крыс в данной группе. Тем не менее отличия от контрольной группы здесь были также достоверными ($p = 0,0288$).

Существенное отличие в эффектах смесей антибиотиков обнаружено при анализе титра лактобацилл. Применение смеси ампициллина тригидрата и метронидазола у крысят вызывало снижение титра пробиотических *Lactobacillus* spp. в среднем на полтора порядка по сравнению с контролем ($p = 0,0023$), а амоксициллин и цефалексин не оказывали значимого влияния на титр лактобацилл. Вместе с тем подавление роста лактобацилл при применении первой смеси было не столь существенным, как в случае бифидобактерий: ни у одного животного не было отмечено полной элиминации.

Аналогичные результаты получены для энтерококков: эффекты были отмечены только в случае применения первой смеси – содержание в толстом кишечнике *Enterococcus* spp. по сравнению с контролем было ниже в среднем на полтора порядка ($p = 0,0011$). Во второй группе, получившей другую смесь антибиотиков, отличий от контрольных значений в содержании энтерококков в кишечнике не выявлено.

Анализ данных по грибам рода *Candida* показал, что применение у крысят обеих смесей в течение 3 сут значимо снижает их содержание в толстом кишечнике. Количество животных с полной элиминацией данного микроорганизма в каждой экспериментальной группе составило 20 %. Таким образом, существенной разницы в действии двух смесей антибиотиков на содержание кандид в толстом кишечнике крысят не обнаружено.

Наконец, анализ титра *E. coli* в содержимом толстого кишечника крысят не выявил отличий от контрольных значений ни в одной из экспериментальных групп. Другими словами, использованные в течение 3 сут смеси антимикробных препаратов не влияли на титр кишечной палочки в кишечнике крысят.

По совокупности полученных данных можно заключить, что смесь ампициллина тригидрата и метронидазола по сравнению со смесью амоксициллина и цефалексина оказывала более выраженный дисбиотический эффект, направленный прежде всего на пробиотические микроорганизмы. Таким образом, смесь ампициллина тригидрата и метронидазола можно использовать для моделирования антибиотик-ассоциированного дисбиоза в детском возрасте.

На втором этапе исследования для анализа динамики изменения показателей в раннем возрасте в качестве дисбиотического фактора использовали смесь ампициллина тригидрата и метронидазола. Кроме того, оценивали динамику изменения показателей у контрольных животных, а также у животных, получавших 2'-фукозиллактозу в норме и после малактоделирования кишечного дисбиоза (табл. 2).

Таблица 2. Динамика изменения титра некоторых представителей кишечной микробиоты в различных группах

Table 2. Dynamics of titer changes of some representatives of the intestinal microbiota in different groups

Группа	Титр представителей кишечной микробиоты		
	возраст 15 дней	возраст 19 дней	возраст 26 дней
<i>Bifidobacterium</i> spp., log КОЕ/г			
Контроль	8,9 (7,9; 9,3)	8,7 (8,1; 9,3)	6,8 (6,4; 8,0) ^{15,19}
2'-Фукозиллактоза	7,9 (7,9; 8,4)	8,1 (8,1; 8,4)	8,8 (8,0; 9,5)*
Дисбиоз	0 (0; 2,9)*	7,7 (6,4; 8,2)	6,9 (6,4; 6,9)
Дисбиоз + 2'-фукозиллактоза	0 (0; 7,9)*	9,6 (3,2; 9,7)	7,9 (7,9; 7,9) [#]
<i>Lactobacillus</i> spp., log КОЕ/г			
Контроль	6,9 (6,5; 7,3)	7,1 (7,0; 8,2)	6,8 (6,5; 7,5)
2'-Фукозиллактоза	6,9 (6,9; 7,5)	6,9 (6,3; 8)	6,9 (6,3; 7,1)
Дисбиоз	5,4 (4,9; 5,8)*	6,3 (6,0; 6,3)	6,6 (6,5; 7,0)
Дисбиоз + 2'-фукозиллактоза	5,3 (4,1; 5,9)*	5,9 (5,9; 6,2)*	7,9 (7,2; 7,9)
<i>Enterococcus</i> spp., log КОЕ/г			
Контроль	6,3 (6,2; 6,5)	6,4 (6,0; 6,6)	6,0 (5,7; 6,1) ¹⁵
2'-Фукозиллактоза	6,3 (6,2; 6,4)	6,5 (6,3; 6,6)	6,1 (5,7; 6,4)
Дисбиоз	4,8 (4,6; 5,3)*	6,1 (6,0; 6,3)	6,3 (6,3; 6,9)
Дисбиоз + 2'-фукозиллактоза	0 (0;0)*	5,9 (5,9; 6,1)	6,9 (6,8; 6,9)*
<i>Escherichia coli</i> , log КОЕ/г			
Контроль	5,0 (0; 6,1)	1,0 (0; 1,0)	5,5 (4,8; 6,0) ¹⁹
2'-фукозиллактоза	6,0 (6,0; 6,9)	0,8 (0,6; 0,9)	5,3 (5,0; 5,8)
Дисбиоз	5,8 (5,3; 6,0)	5,4 (1,8; 5,7)	5,6 (5,4; 5,7)
Дисбиоз + 2'-фукозиллактоза	4,3 (0; 6,0)	5,1 (5,6; 5,9)*	4,5 (1; 5,3)
<i>Candida</i> spp., log КОЕ/г			
Контроль	6,6 (6,5; 8,0)	5,7 (5,3; 6,1) ¹⁵	5,9 (5,7; 6,3) ¹⁵
2'-Фукозиллактоза	6,4 (6,3; 6,7)	5,7 (5,4; 5,8)	6,1 (5,7; 6,3)
Дисбиоз	4,3 (4,0; 4,9)*	6,1 (5,8; 6,6)	6,9 (5,8; 6,9)
Дисбиоз + 2'-фукозиллактоза	5,5 (4,6; 6,3)*	5,8 (5,6; 5,9)	6,8 (6,8; 6,9)

Примечание. Достоверность отличий: * – от показателей контрольных животных в том же возрасте; # – от показателей животных группы «дисбиоз» в том же возрасте; 15, 19 – от показателей животных в возрасте 15 или 19 сут той же группы.

Установлено, что у контрольных животных содержание бифидобактерий в кишечнике в возрасте 15 и 19 сут остается стабильным – на уровне 8–9 log КОЕ/г. Однако в возрасте 26 сут отмечено значимое снижение содержания данного микроорганизма в среднем на два порядка по сравнению как с 15-ми, так и с 19-ми сутками ($p = 0,008$ и $p = 0,004$ соответственно). Более того,

при проведении дополнительной серии экспериментов ($n = 5$) было выявлено, что у контрольных животных в возрасте 33 сут титр *Bifidobacterium* spp. составляет 7,7 (7,6; 7,7) log КОЕ/г, не отличаясь от значений в 26 сут ($p = 0,56$) и оставаясь ниже уровня в 15 и 19 сут ($p = 0,045$ и $p = 0,014$ соответственно). Такое снижение титра бифидобактерий в возрасте старше 26 сут может быть связано с окончанием периода вскармливания и полным переходом на питание твердой пищей, так как по правилам разведения начиная с 22-х суток крысят отсаживают от матери. Нельзя также исключать влияния возрастных изменений в физиологии толстого кишечника, которые приводят к существенной перестройке баланса микробиоты кишечника. К возможным факторам можно отнести изменение функционального состояния лимфоидной ткани, секреторных клеток слизистой оболочки, иннервации или моторики толстого кишечника.

В отличие от бифидобактерий, титр *Lactobacillus* spp. оставался у контрольных крысят относительно постоянным во всех анализируемых возрастах. Исходя из этого, можно заключить, что для контрольных животных характерно относительное постоянство количества данного рода пробиотических бактерий кишечника, которое не зависит от окончания периода вскармливания или возрастных изменений.

При анализе содержания энтерококков отмечалась та же тенденция, что и у бифидобактерий, однако не столь выраженная. В частности, важно отметить умеренное, но значимое снижение содержания *Enterococcus* spp. в кишечнике крысят в возрасте 26 сут по сравнению с 15-ми сутками ($p = 0,04$). При этом показатель также не восстанавливался к возрасту 33 сут и составлял 5,6 (4,9; 5,8) log КОЕ/г. Данное снижение может быть связано также с прекращением вскармливания и окончательным переходом на твердую пищу либо с возрастными особенностями физиологии кишечника и организма в целом.

У контрольных животных в возрасте 19 сут отмечалось более низкое содержание бактерий группы кишечной палочки, чем в возрасте 26 сут. Отсутствие значимых различий по сравнению с точкой 15 сут может быть связано с высокой вариабельностью данного показателя в первой точке исследования. Однако в возрасте 26 сут происходил значимый рост содержания данного микроорганизма по сравнению с таковым в возрасте 19 сут ($p = 0,031$). Достоверное падение титра *E. coli* в толстом кишечнике крысят в контрольной точке 19 сут может быть связано как со смешанным питанием животных (грудное вскармливание и твердая пища), так и с возрастными особенностями развития кишечной микробиоты и иммунной системы.

Содержание грибов рода *Candida* у контрольных животных было максимальным в возрасте 15 сут, а затем значимо снижалось в возрасте 19 сут ($p = 0,001$) и 26 сут ($p = 0,004$). Известно, что бактерии и кандиды кишечника находятся в непосредственном антагонизме, взаимно подавляя рост друг друга. Однако, несмотря на это, корреляционный анализ не установил связи между титрами этих микроорганизмов, а изменения с возрастом были однонаправленными. Нельзя исключать, что подавление роста кандид связано с ростом других доминирующих групп бактерий. Вместе с тем установленные изменения в титре кандид могут быть вызваны более мощными факторами, такими же, которые приводили к флуктуации в уровне групп пробиотических бактерий кишечника: постепенное прекращение вскармливания молоком, начало перехода на твердую пищу в возрасте 15–18 сут и возрастные изменения в физиологии кишечника.

Таким образом, в период с 15-х по 26-е сутки после рождения у крысят отмечается существенное изменение баланса рассмотренных представителей кишечной микробиоты: снижается титр бифидобактерий, энтерококков и дрожжеподобных грибов, а титр кишечной палочки снижается временно на 19-е сутки. При этом лактобациллы кишечника остаются на стабильном уровне в течение всего изученного периода постнатального развития.

Применение пребиотика 2'-фукозиллактозы у крысят оказывало положительное влияние на содержание бифидобактерий. В возрасте 15 и 19 сут содержание *Bifidobacterium* spp. не отличалось от аналогичного показателя у контрольных животных. Вместе с тем в возрасте 26 сут титр бифидобактерий не снижался и был значимо выше, чем у контрольных животных того же возраста ($p = 0,01$). Сохранение титра бифидобактерий в течение более длительного периода может позитивно влиять на индивидуальное развитие организма в раннем возрасте, в частности на развитие иммунной, эндокринной и нервной систем [21–23].

Применение 2'-фукозиллактозы не оказывало значимого влияния на содержание лактобацилл в кишечном содержимом крысят разного возраста: у животных, которым давали данный пребиотик, сохранялось постоянство медианных значений содержания *Lactobacillus* spp., характерное также для контрольных крысят.

Титр *Enterococcus* spp. в условиях потребления 2'-фукозиллактозы также оставался относительно постоянным во всех точках наблюдения. Важно отметить отсутствие значимого снижения титра энтерококков в возрасте 26 сут по сравнению с 15-ми сутками, характерное для контрольных животных. Таким образом, применение 2'-фукозиллактозы, как и в случае с бифидобактериями, также приводило к сохранению титра *Enterococcus* spp., но эффект был менее выраженным. Учитывая пробиотические свойства основных видов рода – *E. faecalis* и *E. faecium* [24, 25] – такой эффект пребиотика можно считать позитивным. Применение 2'-фукозиллактозы не влияло на возрастную динамику содержания *E. coli* и *Candida* spp.

Исходя из изложенного выше, можно сделать вывод, что применение 2'-фукозиллактозы оказывало значимое влияние на сохранение титра важных родов пробиотических бактерий *Bifidobacterium* spp. и *Enterococcus* spp. с возрастом. В случае *Lactobacillus* spp., *E. coli* и *Candida* spp. применение пребиотика не оказывало значимого влияния на возрастные изменения, характерные для контрольных животных.

Как указывалось выше, применение смеси ампициллина тригидрата и метронидазола приводило к практически полной элиминации *Bifidobacterium* spp. на 15-е сутки. Вместе с тем к 19-м суткам происходило восстановление титра бифидобактерий – значения не отличались от контрольных ($p = 0,12$). На 26-е сутки отмечалось снижение титра, что было характерно и для контрольных крысят. Применение 2'-фукозиллактозы на фоне антибиотик-ассоциированного дисбиоза кишечника не сказывалось существенно на медианных значениях титра бифидобактерий на 15-е сутки. Однако важно отметить, что в данном случае доля животных с полной элиминацией этих пробиотических бактерий была меньше: 57 % против 71 % в группе без применения пребиотика. Кроме того, применение 2'-фукозиллактозы оказало положительное влияние на сохранение титра данного рода бактерий на 26-е сутки после применения антибиотиков в более раннем возрасте. Это выражалось в том, что титр бифидобактерий здесь был значимо выше ($p = 0,01$), чем в группе крысят, получавших антибиотики без введения пребиотика. Как отмечалось выше, сохранение бифидобактерий в более позднем возрасте может быть особенно важно для развития регуляторных систем организма, которое может быть нарушено в связи с развитием антибиотик-ассоциированного дисбиоза в раннем возрасте.

Применение 2'-фукозиллактозы на фоне развития дисбиоза не сказывалось на снижении титра лактобацилл, вызванном действием антибиотиков: отличия здесь также были достоверными по сравнению с контрольной группой ($p = 0,01$). В возрасте 19 сут после моделирования дисбиоза у крысят сохранялась тенденция к снижению титра лактобацилл, однако показатель достоверно не отличался от контрольных значений. Вместе с тем при применении 2'-фукозиллактозы пониженный титр лактобацилл сохранялся до 19 сут. Однако важно отметить, что в данном случае не обнаружены отличия между крысами, получавшими только антибиотики, и крысами, получавшими антибиотики и пребиотик. В возрасте 26 сут восстановление показателя до его значений у контрольных животных происходило в обеих группах.

Ранее было отмечено, что развитие антибиотик-ассоциированного дисбиоза приводило к снижению содержания энтерококков в кишечнике в ранний постнатальный период (15 сут). Однако далее наблюдалось восстановление содержания данных микроорганизмов до уровня контроля. Применение 2'-фукозиллактозы не сказывалось на эффекте антибиотиков на 15-е и 19-е сутки. Однако на 26-е сутки в группе сочетанного применения антибиотиков с 2'-фукозиллактозой отмечалось умеренное увеличение титра энтерококков, тогда как в контрольной группе наблюдалось умеренное его уменьшение. Влияние 2'-фукозиллактозы на титр энтерококков кишечника в условиях модели дисбиоза, вероятно, опосредовано сочетанием двух факторов. Умеренное позитивное влияние пребиотика на рост энтерококков, которое было отмечено для контрольных животных, в случае модели дисбиоза было усилено восстановительным ростом этих бактерий за счет потенциального снижения конкуренции с другими группами бактерий. Важно отметить,

что отличия между группами животных в возрасте 26 сут были достоверными, но не столь выраженными – менее одного порядка.

Применение смеси ампициллина тригидрата и метронидазола не приводило к значимому снижению содержания бактерий группы кишечной палочки у животных в возрасте 15 сут по сравнению с контролем. Вместе с тем в возрасте 19 сут после моделирования дисбиоза кишечника не происходило характерного для контрольных животных падения показателя. Применение пребиотика на фоне модели не сказывалось на этой динамике: титр бактерий группы кишечной палочки был выше, чем у контрольных животных ($p = 0,04$). В обеих группах с применением антибиотиков на 26-е сутки показатель не отличался от контрольных значений. Отсутствие существенного влияния антибиотиков на титр кишечной палочки можно объяснить ее быстрым восстановлением в течение суток после последнего введения антибиотиков и одновременным уменьшением конкуренции за субстрат в условиях уменьшения титра других микроорганизмов. Вероятно, этот восстановительный рост приводит к тому, что после применения антибиотиков не происходит характерного снижения титра кишечной палочки в возрасте 19 сут.

Установлено, что развитие антибиотик-ассоциированного дисбиоза приводит к снижению содержания кандид у животных в возрасте 15 сут по сравнению с контролем. Однако в возрасте 19 и 26 сут происходило их восстановление до уровня контрольных значений. Аналогичное временное снижение содержания кандид отмечалось и в случае применения 2'-фукозиллактозы на фоне развития дисбиоза ($p = 0,0003$). Снижение содержания кандид в возрасте 15 сут, по-видимому, связано с применением смеси антибиотиков, содержащей метронидазол. Ранее было показано, что применение подобной смеси приводит также к угнетению роста кандид [26].

Заключение. Смесь ампициллина тригидрата 75 мг/кг и метронидазола 50 мг/кг оказывает выраженный дисбиотический эффект и может быть использована для моделирования дисбиоза кишечника в раннем возрасте. При этом важно учитывать, что период вскармливания, по-видимому, способствует быстрому восстановлению показателей сразу после прекращения введения антибиотиков. У контрольных крысят впервые описаны некоторые возрастные изменения в титре представителей кишечной микробиоты. В частности, отмечено снижение содержания *Bifidobacterium* spp. и *Enterococcus* spp. в возрасте 26 сут, а также снижение уровня *E. coli* в возрасте 19 сут. При этом содержание *Lactobacillus* spp. у крысят в этот период не изменяется.

Применение 2'-фукозиллактозы способствует сохранению титра *Bifidobacterium* spp. и *Enterococcus* spp., что подтверждает пребиотические свойства этого олигосахарида грудного молока. При этом на фоне развития дисбиоза в раннем возрасте применение 2'-фукозиллактозы приводит к сохранению титра бифидобактерий и умеренному росту титра энтерококков у животных в возрасте 26 сут.

Таким образом, у крысят в ранний постнатальный период кишечная микробиота характеризуется лабильностью, что связано с ее формированием, а также с развитием функциональных систем организма. Применение антибиотиков оказывает выраженный дисбиотический эффект, который является временным, но может сказаться на дальнейшем развитии организма. Применение 2'-фукозиллактозы приводит к сохранению важных пробиотических групп бактерий кишечника как в норме, так и после перенесенного дисбиоза, что может оказать положительное влияние на организм в более позднем возрасте.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. The microbiota-gut-brain axis / J. F. Cryan [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2019. – Vol. 99, N 4. – P. 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
2. Sonnenburg, J. L. Vulnerability of the industrialized microbiota / J. L. Sonnenburg, E. D. Sonnenburg // *Science.* – 2019. – Vol. 366, N 6464. – P. eaaw9255. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9255>
3. The potential role of gut microbiota in Alzheimer's disease: From diagnosis to treatment / A. Varesi [et al.] // *Nutrients.* – 2022. – Vol. 14, N 3. – Art. 688. <https://doi.org/10.3390/nu14030668>
4. Probiotics, prebiotics and postbiotics on mitigation of depression symptoms: Modulation of the brain-gut-microbiome axis / A. Chudzik [et al.] // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11, N 7. – Art. 1000. <https://doi.org/10.3390/biom11071000>

5. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases / E. Rinninella [et al.] // *Microorganisms*. – 2019. – Vol. 7, N 1. – Art. 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
6. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: A door to the body / F. Cristofori [et al.] // *Front Immunol*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 578386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.578386>
7. Why are bifidobacteria important for infants? / G. Stuijvenberg [et al.] // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10, N 2. – Art. 278. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020278>
8. Yadav, M. A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition / M. Yadav, M. K. Verma, N. S. Chauhan // *Arch. Microbiol*. – 2018. – Vol. 200, N 2. – P. 203–217. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1459-x>
9. The human microbiome project / P. J. Turnbaugh [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 449, N 7164. – P. 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
10. Zeissig, S. Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease / S. Zeissig, R. S. Blumberg // *Nat. Immunol*. – 2014. – Vol. 15, N 4. – P. 307–310. <https://doi.org/10.1038/ni.2847>
11. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis / S. Jangi [et al.] // *Nat. Commun*. – 2016. – Vol. 7. – Art. 12015. <https://doi.org/10.1038/ncomms12015>
12. Minireview on the relations between gut microflora and Parkinson's disease: Further biochemical (oxidative stress), inflammatory, and neurological particularities / O.-D. Ilie [et al.] // *Oxid. Med. Cell Longev*. – 2020. – Vol. 2020. – Art. 4518023. <https://doi.org/10.1155/2020/4518023>
13. The gut microbiota and Alzheimer's disease / C. Jiang [et al.] // *J. Alzheimer's Dis*. – 2017. – Vol. 58, N 1. – P. 1–15. <https://doi.org/10.3233/JAD-161141>
14. Mulle, J. G. The gut microbiome: a new frontier in autism research / J. G. Mulle, W. G. Sharp, J. F. Cubells // *Curr. Psych. Rep*. – 2013. – Vol. 15, N 2. – Art. 337. <https://doi.org/10.1007/s11920-012-0337-0>
15. Gut bacterial dysbiosis in children with intractable epilepsy / K. Lee [et al.] // *J. Clin. Med*. – 2021. – Vol. 10, N 1. – Art. 5. <https://doi.org/10.3390/jcm10010005>
16. The effects of inulin on gut microbial composition: a systematic review of evidence from human studies / Q. L. Bastard [et al.] // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. – 2020. – Vol. 39, N 3. – P. 403–413. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03721-w>
17. Patel, S. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review / S. Patel, A. Goyal // *3 Biotech*. – 2012. – Vol. 2, N 2. – P. 115–125. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0044-x>
18. Viral infections, the microbiome, and probiotics / A. Harper [et al.] // *Front Cell Infect. Microbiol*. – 2021. – Vol. 10. – Art. 596166. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.596166>
19. Recent advances on 2'-fucosyllactose: physiological properties, applications, and production approaches / Y. Zhu [et al.] // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. – 2022. – Vol. 62, N 8. – P. 2083–2092. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1850413>
20. Li, R. Comparative analysis of oligosaccharides in the milk of human and animals by using LC-QE-HF-MS / R. Li, Y. Zhou, Y. Xu // *Food Chem.: X*. – 2023. – Vol. 18. – Art. 100705. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100705>
21. Effect of probiotic bifidobacterium breve in improving cognitive function and preventing brain atrophy in older patients with suspected mild cognitive impairment: Results of a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial / D. Asaoka [et al.] // *J. Alzheimer's Dis*. – 2022. – Vol. 88, N 1. – P. 75–95. <https://doi.org/10.3233/JAD-220148>
22. Bifidobacterium animalis subsp. lactis boosts neonatal immunity: unravelling systemic defences against *Salmonella* / C. Lin [et al.] // *Food Funct*. – 2024. – Vol. 15, N 1. – P. 234–254. <https://doi.org/10.1039/D3FO03686C>
23. Beneficial effects of probiotic bifidobacterium longum in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rats / O. E. Zubareva [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. – 2023. – Vol. 24, N 9. – Art. 8451. <https://doi.org/10.3390/ijms24098451>
24. The many faces of *Enterococcus* spp. – commensal, probiotic and opportunistic pathogen / B. Krawczyk [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9, N 9. – Art. 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
25. A potentially probiotic strain of *Enterococcus faecalis* from human milk that is avirulent, antibiotic sensitive, and nonbreaching of the gut barrier / J. Anjum [et al.] // *Arch. Microbiol*. – 2022. – Vol. 204, N 2. – Art. 158. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02754-8>
26. The global dissemination of hospital clones of *Enterococcus faecium* / S. J. van Hal [et al.] // *Gen. Med*. – 2021. – Vol. 13, N 1. – Art. 52. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00868-0>
27. Insight into gut dysbiosis of patients with inflammatory bowel disease and ischemic colitis / R. H. Dahal [et al.] // *Front Microbiol*. – 2023. – Vol. 14. – Art. 1174832. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1174832>
28. Chronic liver disease enables gut *Enterococcus faecalis* colonization to promote liver carcinogenesis / N. Iida [et al.] // *Nat. Cancer*. – 2021. – Vol. 2, N 10. – P. 1039–1054. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00251-3>
29. Chang, M. Amphotericin B-metronidazole combination against *Candida* spp. / M. R. Chang, A. E. Cury // *Rev. Iberoam. Micol*. – 1998. – Vol. 15, N 2. – P. 78–80.

References

1. Cryan J. F., O'Riordan K. J., Cowan C. S. M., Sandhu K. V., Bastiaanssen T. F. S., Boehme M. [et al.]. The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews*, 2019, vol. 99, no. 4, pp. 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
2. Sonnenburg J., Sonnenburg E. Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science*, 2019, vol. 366, no. 6464, p. eaaw9255. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9255>

3. Varesi A., Pierella E., Romeo M., Piccini G., Alfano C., Björklund G. [et al.]. The potential role of gut microbiota in Alzheimer's disease: From diagnosis to treatment. *Nutrients*, 2022, vol. 14, no. 3, art. 688. <https://doi.org/10.3390/nu14030668>
4. Chudzik A., Orzyłowska A., Rola R., Stanisław G. J. Probiotics, prebiotics and postbiotics on mitigation of depression symptoms: Modulation of the brain-gut-microbiome axis. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, no. 7, art. 1000. <https://doi.org/10.3390/biom11071000>
5. Rinninella E., Raoul P., Cintoni M., Franceschi F., Donato Miggiano G. A., Gasbarrini A., Mele M. C. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 1, art. 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
6. Cristofori F., Dargenio V. N., Dargenio C., Miniello V. L., Barone M., Francavilla R. Anti-Inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: A door to the body. *Frontiers in Immunology*, 2021, vol. 12, art. 578386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.578386>
7. Stuijvenberg G., Burton J., Bron P., Reid G. Why Are bifidobacteria important for infants? *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no. 2, art. 278. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020278>
8. Yadav M., Verma M. K., Chauhan N. S. A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Archives of Microbiology*, 2018, vol. 200, no. 2, pp. 203–217. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1459-x>
9. Turnbaugh P. J., Ley R. E., Hamady M., Fraser-Liggett C. M., Knight R., Gordon J. I. The human microbiome project. *Nature*, 2007, vol. 449, no. 7164, pp. 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
10. Zeissig S., Blumberg R. S. Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nature Immunology*, 2014, vol. 1, no. 4, pp. 307–310. <https://doi.org/10.1038/ni.2847>
11. Jangi S., Gandhi R., Cox L., Li N., von Glehn F., Yan R. [et al.]. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature Communications*, 2016, vol. 7, art. 12015. <https://doi.org/10.1038/ncomms12015>
12. Ilie O.-D., Ciobica A., McKenna J., Doroftei B., Mavroudis I. Minireview on the relations between gut microflora and Parkinson's disease: Further biochemical (oxidative stress), inflammatory, and neurological particularities. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, vol. 2020, art. 4518023. <https://doi.org/10.1155/2020/4518023>
13. Jiang C., Li G., Huang P., Liu Z., Zhao B. The gut microbiota and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017, vol. 58, pp. 1–15. <https://doi.org/10.3233/JAD-161141>
14. Mulle J. G., Sharp W. G., Cubells J. F. The gut microbiome: a new frontier in autism research. *Current Psychiatry Reports*, 2013, vol. 15, no. 2, art. 337. <https://doi.org/10.1007/s11920-012-0337-0>
15. Lee K., Kim N., Shim J. O., Kim G.-H. Gut bacterial dysbiosis in children with intractable epilepsy. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, vol. 10, no. 1, art. 5. <https://doi.org/10.3390/jcm10010005>
16. Bastard Q. L., Chapelet G., Javaudin F., Lepelletier D., Batard E., Montassier E. The effects of inulin on gut microbial composition: a systematic review of evidence from human studies. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2020, vol. 39, no. 3, pp. 403–413. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03721-w>
17. Patel S., Goyal A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech*, 2012, vol. 2, no. 2, pp. 115–125. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0044-x>
18. Harper A., Vijayakumar V., Ouwehand A., Ter Haar J., Obis D., Espadaler J., Binda S., Desiraju S., Day R. Viral infections, the microbiome, and probiotics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, vol. 10, art. 596166. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.596166>
19. Zhu Y., Wan L., Li W., Ni D., Zhang W., Yan X., Mu W. Recent advances on 2'-fucosyllactose: physiological properties, applications, and production approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, vol. 62, no. 8, pp. 2083–2092. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1850413>
20. Li R., Zhou Y., Xu Y. Comparative analysis of oligosaccharides in the milk of human and animals by using LC-QE-HF-MS. *Food Chemistry: X*, 2023, vol. 18, art. 100705. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100705>
21. Asaoka D., Xiao J., Takeda T., Yanagisawa N., Yamazaki T., Matsubara Y. [et al.]. Effect of probiotic bifidobacterium breve in improving cognitive function and preventing brain atrophy in older patients with suspected mild cognitive impairment: Results of a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2022, vol. 88, no. 1, pp. 75–95. <https://doi.org/10.3233/JAD-220148>
22. Lin C., Lin Y., Wang S., Wang J., Mao X., Zhou Y., Zhang H., Chen W., Wang G. Bifidobacterium animalis subsp. lactis boosts neonatal immunity: unravelling systemic defences against *Salmonella*. *Food and Function*, 2024, vol. 15, no. 1, pp. 234–254. <https://doi.org/10.1039/D3FO03686C>
23. Zubareva O. E., Dyomina A. V., Kovalenko A. A., Roginskaya A. I., Melik-Kasumov T. B., Korneeva M. A. [et al.]. Beneficial effects of probiotic bifidobacterium longum in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no. 9, art. 8451. <https://doi.org/10.3390/ijms24098451>
24. Krawczyk B., Wityk P., Gałęcka M., Michalik M. The many faces of *Enterococcus* spp. – commensal, probiotic and opportunistic pathogen. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, no. 9, art. 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
25. Anjum J., Zaidi A., Barrett K., Tariq M. A potentially probiotic strain of *Enterococcus faecalis* from human milk that is avirulent, antibiotic sensitive, and nonbreaching of the gut barrier. *Archives of Microbiology*, 2022, vol. 204, no. 2, art. 158. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02754-8>
26. van Hal S. J., Willems R. J. L., Gouliouris T., Ballard S. A., Coque T. M., Hammerum A. M. [et al.]. The global dissemination of hospital clones of *Enterococcus faecium*. *Genome Medicine*, 2021, vol. 13, no. 1, art. 52. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00868-0>
27. Dahal R. H., Kim S., Kim Y. K., Kim E. S., Kim J. Insight into gut dysbiosis of patients with inflammatory bowel disease and ischemic colitis. *Frontiers in Microbiology*, 2023, vol. 14, art. 1174832. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1174832>

28. Iida N., Mizukoshi E., Yamashita T., Yutani M., Seishima J., Wang Z. [et al.]. Chronic liver disease enables gut *Enterococcus faecalis* colonization to promote liver carcinogenesis. *Nature Cancer*, 2021, vol. 2, no. 10, pp. 1039–1054. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00251-3>

29. Chang M. R., Cury A. E. Amphotericin B-metronidazole combination against *Candida* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, 1998, vol. 15, no. 2, pp. 78–80.

Информация об авторах

Жабинская Аlesia Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lesiaalex26@gmail.com

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

Пыж Анна Эдуардовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Hanna.pyzh@gmail.com

Information about the authors

Alesia A. Zhabinskaya – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lesiaalex26@gmail.com

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

Hanna E. Pyzh – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Hanna.pyzh@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 615.256.51:547.567.5

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-345-352>

Поступила в редакцию 05.07.2023

Received 05.07.2023

О. С. Рашкевич, А. В. Волчек

*Белорусский государственный медицинский университет,
Минск, Республика Беларусь*

АНТИГИПОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ КОМБИНАЦИИ БЕМИТИЛА И ТИМОХИНОНА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРКАПНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Аннотация. В работе на модели гиперкапнической гипоксии в герметичном объеме изучено антигипоксическое действие комбинации беметила и тимохинона при их однократном внутривентральном введении мышам. Тимохинон оказывал дозозависимое защитное действие, повышая устойчивость животных к гипоксии, в дозе 10 мг/кг увеличивал продолжительность жизни мышей на 75,9 % по сравнению с контрольной группой, а в дозе 30 мг/кг – на 90,2 %. Рассчитанная методом регрессионного анализа среднеэффективная доза тимохинона на данной модели составила 14,1 мг/кг, среднеэффективная доза беметила – 148 мг/кг. При сочетании беметила и тимохинона в соотношении 5 : 1 активность соединений существенно возрастала, ED50 беметила снижалась до 39,0 мг/кг, а аналогичный показатель тимохинона составил 7,8 мг/кг. Введение комбинации 100 мг/кг беметила и 20 мг/кг тимохинона мышам приводило к увеличению продолжительности их жизни в стандартных условиях гипоксии до $41,2 \pm 5,7$ мин, что на 120,5 % больше аналогичного показателя у животных, получавших плацебо. Анализ фармакодинамики комбинации препаратов по Т. Чоу показал аддитивный тип взаимодействия, характерный для соединений с различными молекулярными мишенями. Установлено, что комбинация беметила и тимохинона в соотношении 5 : 1 демонстрирует фармакологический синергизм, что позволяет снижать дозы компонентов при их сочетанном применении в 1,8–4,0 раза.

Ключевые слова: беметил, тимохинон, гипоксия, гиперкапния, мыши, антигипоксанты, синергичные комбинации

Для цитирования: Рашкевич, О. С. Антигипоксический эффект комбинации беметила и тимохинона в условиях гиперкапнической гипоксии / О. С. Рашкевич, А. В. Волчек // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 4. – С. 345–352. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-345-352>

Olga S. Rashkevich, Aliaksandr U. Vauchok

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

ANTIHYPOXIC EFFECT OF A COMBINATION OF BEMETHYL AND THYMOQUINONE UNDER HYPERCAPNIC HYPOXIA

Abstract. The antihypoxic effect of a combination of bemethyl and thymoquinone after single intraperitoneal injection was studied in a model of hypercapnic hypoxia in a hermetic volume in mice. Thymoquinone had a dose-dependent protective effect by increasing the resistance of animals to hypoxia. At a dose of 10 mg/kg, it increased the life expectancy by 75.9 % compared with the control group, and at a dose of 30 mg/kg – by 90.2 %. The average effective dose of thymoquinone calculated by the regression analysis in this model was 14.1 mg/kg and the average effective dose of bemethyl was 148 mg/kg. As part of a combination of bemethyl and thymoquinone in the ratio of 5 : 1, the activity of the compounds increases significantly, ED50 of bemethyl decreases to 39.0 mg/kg, the same indicator for thymoquinone becomes 7.8 mg/kg. Administration of a combination of 100 mg/kg of bemethyl and 20 mg/kg of thymoquinone to mice leads to increasing their lifespan under the standard hypoxic conditions up to 41.2 ± 5.7 minutes, which is 120.5 % more than in animals receiving placebo. The analysis of pharmacodynamics of a combination of drugs according to T. Chou showed an additive type of interaction typical for compounds with different mechanisms of primary action. It was established that a combination of bemethyl and thymoquinone in the weight ratio of 5 : 1 demonstrate synergism, which makes it possible to reduce 1.8–4.0 times the doses of components in their combined use.

Keywords: bemethyl, thymoquinone, hypoxia, hypercapnia, mice, antihypoxants, synergistic combinations

For citation: Rashkevich O. S., Vauchok A. U. Antihypoxic effect of a combination of bemethyl and thymoquinone under hypercapnic hypoxia. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 4, pp. 345–352 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-345-352>

Введение. Гипоксию называют одной из центральных проблем патологии. Кислородное голодание тканей и активация перекисного окисления липидов – типичные процессы, характерные для многих заболеваний, особенно имеющих острое начало, острое течение и сопровожда-

ющихся нарастанием деструктивных изменений в органах. В целях коррекции данных нарушений очевидна потребность в цитопротекторах и средствах, восстанавливающих метаболизм. Подобным действием обладают так называемые антигипоксантами [1], применяемые в некоторых странах мира, однако эффективность и универсальность имеющихся препаратов требует уточнения. Антигипоксические средства должны быть эффективны при экзогенной (высотная болезнь) и эндогенной гипоксии и могут применяться при ишемической патологии мозга и сердца, в терапии респираторной гипоксии при тяжелом течении инфекции, вызванной SARS-CoV-2, и других состояниях. Эталонным представителем класса антигипоксантов называют бемитил (2-этилтиобензимидазола гидробромид), основным фармакологическим свойством которого является повышение устойчивости организма к гипоксии, сохранение и восстановление работоспособности при выполнении физических нагрузок (антигипоксическое и актопротекторное действие).

Актуальной задачей современной фармакологии является поиск способов повышения фармакологической активности и эффективности имеющихся лекарственных средств, что может быть достигнуто, в частности, путем использования синергичных комбинаций. В нашем исследовании с применением стандартизированных апробированных методов математического моделирования [2–5] изучено фармакодинамическое взаимодействие известного антигипоксанта и актопротектора бемитила с тимохиномом. Тимохинон – один из компонентов семян черного тмина (*Nigella sativa*), который, по литературным данным, обладает антиоксидантным, противовоспалительным, антиишемическим, иммуномодулирующим действием [6–9].

Цель работы – установить характер фармакодинамического взаимодействия бемитила и тимохинона и определить антигипоксическую активность и эффективность тимохинона и его комбинации с бемитилом на модели гипоксии-гиперкапнии у мышей.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено в экспериментальной лаборатории кафедры фармакологии БГМУ в соответствии с нормами биомедицинской этики и правилами гуманного обращения с животными. Антигипоксическое действие субстанций и их комбинации исследовали в опытах на 65 мышах-самцах линии C57Bl/6 массой 32–38 г на модели гиперкапнической гипоксии в герметичном объеме [10].

Подопытные и контрольные группы животных, по 6–8 мышей в каждой, формировали методом рандомизации по массе тела в качестве ведущего признака. За 40 мин до эксперимента животным внутривенно однократно вводили бемитил в дозах 50, 100 и 200 мг/кг и тимохинон в дозах 5, 10 и 30 мг/кг в виде суспензий на Твин-80 в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела. Комбинаторные сочетания бемитил/тимохинон исследованы в соотношении 5 : 1 при уровнях пороговых и субпороговых (субэффективных) антигипоксических доз компонентов – 50 мг/кг бемитила + 10 мг/кг тимохинона, 100 мг/кг бемитила + 20 мг/кг тимохинона. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя. Для оценки антигипоксического действия данных препаратов животных по одному помещали в стеклянные контейнеры объемом 270 см³, герметичность которых контролировали путем погружения в сосуд с водой. Время жизни животных регистрировали секундомером.

Тимохинон (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон) был предоставлен кафедрой радиационной медицины и химико-фармацевтических технологий химического факультета Белорусского государственного университета; субстанция бемитила (2-этилтиобензимидазола гидробромид) – производства Института физико-органической химии НАН Беларуси.

Полученные данные обрабатывали с использованием параметрического анализа по критерию Дункана для множественных парных сравнений и непараметрического *U*-критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Различия между группами признавали достоверными при $p < 0,05$.

Анализ фармакодинамического взаимодействия бемитила и тимохинона выполнен по методике Т. Chou [2] посредством специально разработанного интерактивного алгоритма с использованием вычислительных возможностей компьютерной программы Microsoft Excel [3–5]. Методом регрессионного анализа определяли эффективные дозы (ED16–ED84) индивидуальных субстанций и их комбинаторного сочетания. Уравнение регрессии считали качественным

при ошибке аппроксимации данных менее 15 %. Результат взаимодействия оценивали по значению комбинаторного индекса (CI):

$$CI = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j},$$

где $(D)_j$ – доза (концентрация) агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении; $(D_x)_j$ – доза (концентрация) агента, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении.

Значения CI трактовали в соответствии со шкалой Chou–Talalay [2–5]: <0,10 – очень сильный синергизм; 0,10–0,30 – сильный синергизм; 0,30–0,70 – синергизм; 0,70–0,85 – умеренный синергизм; 0,85–0,90 – слабый синергизм; 0,90–1,10 – аддитивный эффект; 1,10–1,20 – слабый антагонизм; 1,20–1,45 – умеренный антагонизм; 1,45–3,30 – антагонизм; 3,30–10,0 – сильный антагонизм; >10 – очень сильный антагонизм.

Индекс снижения дозы (DRI) компонентов комбинации рассчитывали по формуле $DRI = (D_x)_j / (D)_j$.

Значение DRI показывает, во сколько раз можно снизить дозу каждого компонента в синергичной комбинации для достижения эффекта, сопоставимого с индивидуальным действием компонента. Результаты представляли графически в виде рассчитанной путем регрессионного анализа зависимости доза–эффект индивидуальных субстанций и их комбинации; распределений CI–эффект и DRI–эффект.

Результаты и их обсуждение. При помещении мышей в герметически закрытые емкости по мере потребления кислорода концентрация его в сосуде и организме снижается, а количество углекислого газа, наоборот, возрастает – развивается гипоксическая гипоксия с гиперкапнией. Первые признаки гипоксии у животных, получавших плацебо, появлялись, как правило, на 15-й минуте нахождения в герметичной емкости. Вначале отмечали нарушение типичного поведения, отдельные признаки возбуждения, увеличение частоты дыхательных движений. В дальнейшем последовательно отмечали нарушения равновесия и координации, утрату способности удерживать позу, а затем регистрировали отдельные агональные вдохи, остановку дыхания и гибель. Средняя продолжительность жизни мышей контрольной группы в условиях гиперкапнической гипоксии в герметичном сосуде объемом 270 см³ составляла $18,7 \pm 1,5$ мин (таблица, рис. 1). Учитывая, что данная экспериментальная методика стабильно воспроизводилась, а результаты характеризовались относительно невысокой индивидуальной вариабельностью (коэффициент вариабельности $SD < 15\%$), использованную модель можно считать репрезентативной для оценки антигипоксической активности и эффективности лекарственных средств. Максимальное зарегистрированное в нашем исследовании значение продолжительности жизни составило 64 мин у мыши, получившей 100 мг/кг бемитила и 20 мг/кг тимохинона (343 % по отношению к контролю). Эта величина применена в расчетах в качестве предельного показателя эффекта при анализе фармакодинамического взаимодействия компонентов комбинации.

Препарат сравнения бемитил при однократном внутрибрюшинном введении оказывал дозозависимое антигипоксическое действие. Типичные поведенческие проявления кислородного голодания у мышей, получавших бемитил в дозе 200 мг/кг, появлялись значительно позже, а средняя продолжительность жизни была на 95 % больше, чем в группе контроля ($36,4 \pm 4,6$ мин, $p = 0,001$ по критерию Дункана). После назначения лекарственного средства в дозе 100 мг/кг обнаружена тенденция к повышению устойчивости животных к гипоксии, а продолжительность жизни составила $27,3 \pm 3,3$ мин ($p = 0,068$), что на 46,4 % больше, чем в группе контроля. Бемитил в дозе 50 мг/кг однократно не оказывал эффекта, а средняя продолжительность жизни животных была такой же, как и у получавших плацебо ($p = 0,982$). Расчетная ED₅₀ бемитила по антигипоксическому эффекту – 148 мг/кг. Линии регрессии показателей доза–эффект бемитила в лог-нормальных координатах представлены на рис. 2.

Влияние беметила, тимохинона и их комбинаций в соотношении 5 : 1 на продолжительность жизни мышей в условиях острой гипоксии с гиперкапнией (M ± m)

Effect of bemethyl, thymoquinone, and their combinations in the ratio of 5 : 1 on the lifespan of mice under acute hypoxia with hypercapnia (M ± m)

Субстанция	Дозы и их соотношение, мг/кг	Кол-во животных	Продолжительность жизни	
			мин	% к контролю
Плацебо	–	9	18,7 ± 1,5	100 ± 8,0
Бемитил	50	8	19,8 ± 1,7	105,8 ± 8,9
	100	8	27,3 ± 3,3	146,4 ± 17,6
	200	6	36,4 ± 4,6*	195,0 ± 24,5*
Тимохинон	5	8	25,5 ± 2,1	136,6 ± 11,3
	10	6	32,8 ± 5,5*	175,9 ± 29,3*
	30	6	35,5 ± 4,4*	190,2 ± 23,7*
Комбинация беметила и тимохинона в соотношении 5 : 1	50 : 10	6	36,0 ± 3,6*†	192,7 ± 19,4*†
	100 : 20	6	41,2 ± 5,7*†	220,5 ± 30,5*†

Примечание. Достоверность различий ($p < 0,05$ по критерию Дункана): * – в сравнении с плацебо; † – по отношению к индивидуальному эффекту той же дозы беметила.

Тимохинон, испытанный на модели гиперкапнической гипоксии у мышей в диапазоне доз от 5 до 30 мг/кг, оказывал дозозависимое антигипоксическое действие, которое при дозах 10 и 30 мг/кг приближалось к эффекту беметила в дозе 200 мг/кг. После однократного внутривентрального введения тимохинона в дозе 5 мг/кг выявлена тенденция к увеличению резистентности животных к гиперкапнической гипоксии, а продолжительность жизни составила $25,5 \pm 2,1$ мин ($p = 0,276$), что на 36,6 % больше, чем в группе контроля. Тимохинон в дозе 10 мг/кг продлевал жизнь мышей в условиях гипоксии на 75,9 % ($32,8 \pm 5,5$ мин, $p = 0,008$), а в дозе 30 мг/кг – на 90,2 % ($35,5 \pm 4,4$ мин, $p = 0,002$) в тех же условиях. Регрессионный анализ показал дозозависимый характер изменения продолжительности жизни животных, получавших тимохинон (рис. 3), расчетная ED₅₀ тимохинона по антигипоксическому эффекту составила 14,1 мг/кг.

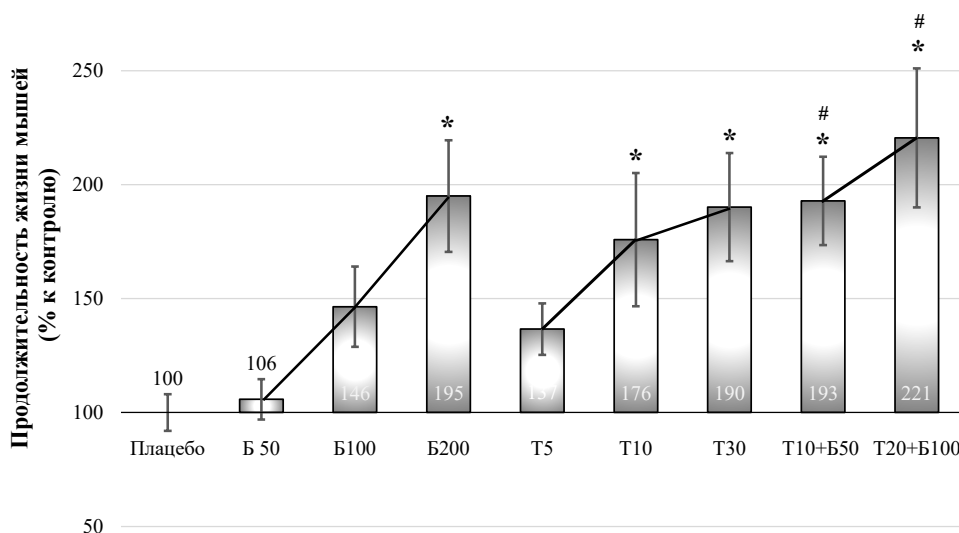


Рис. 1. Влияние беметила (Б), тимохинона (Т) и их комбинаций в соотношении 5 : 1 на продолжительность жизни мышей в условиях острой гипоксии с гиперкапнией (по данным табл. 1), M ± m. Рядом с указанным веществом приведена его доза, мг/кг; различия достоверны ($p < 0,05$ по критерию Дункана) в сравнении с плацебо (*), по отношению индивидуальному эффекту той же дозы беметила (#)

Fig. 1. Effect of bemethyl (B), thymoquinone (T), and their combinations in the ratio of 5 : 1 on the lifespan of mice under acute hypoxia with hypercapnia (according to Table 1); M ± m. Next to the specified substance, its dose is given in mg/kg; differences are significant ($p < 0.05$, Duncan's new multiple range test) in comparison with placebo (*), bemethyl at the same dose (#)

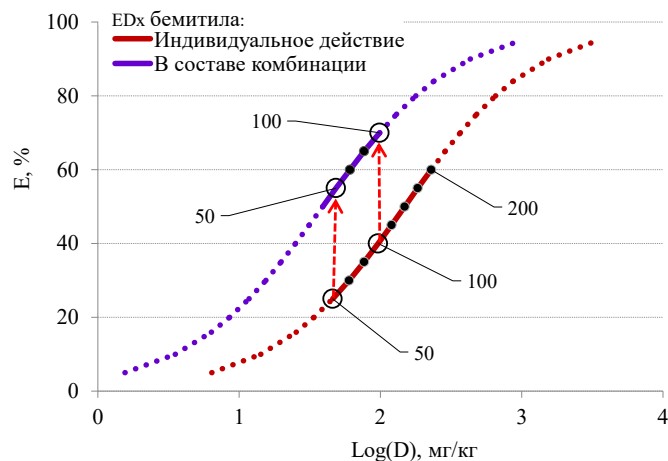


Рис. 2. Кривые доза – антигипоксический эффект при индивидуальном действии беметила и при его сочетании с тимохиноном в соотношении 5 : 1 на модели острой гипоксии-гиперкапнии у мышей. Сплошные сегменты кривых построены с использованием полученных в эксперименте данных, пунктирные – рассчитаны методом регрессионного анализа. Восходящими стрелками соединены показатели эффекта на фармакодинамических кривых в координатах доза–эффект, достигнутые при изолированном применении определенных доз беметила, и тех же доз в составе комбинаций

Fig. 2. Regression curves of the dose-antihypoxic effect in the individual action of bemethyl and as part of a combination with thymoquinone in the ratio of 5 : 1 in a model of hypercapnic hypoxia in a hermetic volume in mice. The solid segments of the curves are constructed using the experimental data, the dotted segments are calculated by the regression analysis method. The ascending arrows connect the effect indicators on the pharmacodynamic curves in dose-effect coordinates, achieved with an isolated use of certain doses of bemethyl, and the same doses in combinations

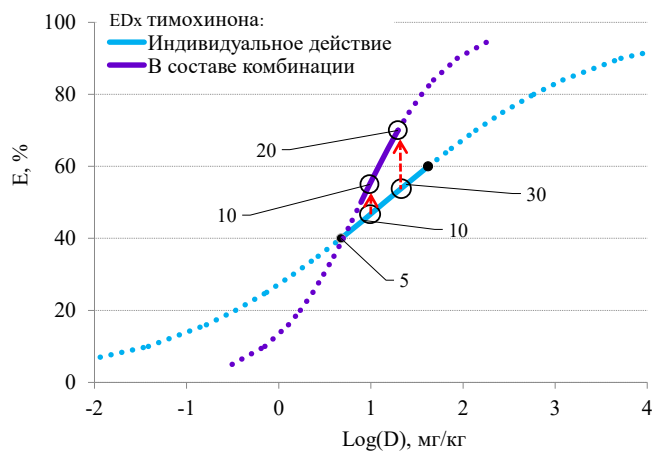


Рис. 3. Кривые доза – антигипоксический эффект при индивидуальном действии тимохинона и при его сочетании с беметилом в соотношении 1 : 5 на модели острой гипоксии-гиперкапнии у мышей. Сплошные сегменты кривых построены с использованием полученных в эксперименте данных, пунктирные – рассчитаны методом регрессионного анализа. Восходящими стрелками соединены показатели эффекта на фармакодинамических кривых в координатах доза–эффект, достигнутые при изолированном применении определенных доз тимохинона, и тех же доз в составе комбинаций

Fig. 3. Regression curves of the dose-antihypoxic effect in the individual action of thymoquinone and as part of a combination with bemethyl in the ratio of 1 : 5 in a model of hypercapnic hypoxia in a hermetic volume in mice. The solid segments of the curves are constructed using the experimentally obtained data, the dotted segments are calculated by the regression analysis method. The ascending arrows connect the effect indicators on the pharmacodynamic curves in dose-effect coordinates, achieved with an isolated use of certain doses of thymoquinone, and the same doses in combinations

При совместном применении беметила и тимохинона в составе комбинации в массовом соотношении 5 : 1 в дозах 50 и 10 мг/кг соответственно продолжительность жизни мышей составила $36,0 \pm 3,6$ мин, что было на 92,7 % больше, чем в группе животных, получавших плацебо ($p = 0,0017$), и отличалась от индивидуального эффекта беметила в дозе 50 мг/кг ($p = 0,0017$). Комбинаторное сочетание 100 мг/кг беметила и 20 мг/кг тимохинона в аналогичных условиях

увеличивало время жизни животных до $41,2 \pm 5,7$ мин (на 120,5 % больше, чем в контроле, $p = 0,00008$), что было существенно дольше, чем при применении аналогичной дозы бемитила ($p = 0,018$). Рассчитанное значение ED50 бемитила в составе комбинации – 39,0 мг/кг, ED50 тимохинона в комбинации – 7,8 мг/кг.

Математический анализ результатов совместного действия бемитила и тимохинона по T. Chou [2] показал, что благодаря аддитивному характеру взаимодействия компонентов комбинации доза бемитила при их комбинаторном сочетании в 3,5–4,1 раз ниже дозы, вызывающей аналогичное индивидуальное действие. В диапазоне ED16–ED84 параметр DRI для бемитила составил 4,0–3,6, а его ED50 в комбинации была в 3,8 раза меньше, чем при отдельном применении. Расчетное значение ED50 тимохинона в составе комбинации было в 1,8 раза меньше, чем при индивидуальном применении. Среднеэффективные дозы комбинации бемитила и тимохинона в соотношении 5 : 1 проявляли умеренный синергизм ($CI_{50} = 0,82 \pm 0,04$), а по мере увеличения дозы синергизм компонентов нарастал ($CI_{60} = 0,56 \pm 0,005$, $CI_{70} = 0,41 \pm 0,001$, $CI_{80} = 0,33 \pm 0,0004$, $CI_{90} = 0,30 \pm 0,0002$).

Таким образом, результаты изучения антигипоксических свойств комбинации бемитила и тимохинона в соотношении 5 : 1 показали аддитивный характер взаимодействия компонентов. Следует отметить, что примененные в эксперименте методы не позволяют оценивать неврологический, вегетативный и метаболический статус животных в динамике адаптации к гипоксии. С другой стороны, многие противоишемические средства с доказанной клинической эффективностью (мельдоний, эмоксипин, мемантин) при однократном применении не обнаруживают антигипоксического действия на использованной нами модели гиперкапнической гипоксии в герметичном объеме [8]. Принимая во внимание перечисленные особенности гипоксии с гиперкапнией в замкнутом объеме, представляется интересным дальнейшее изучение обнаруженного в настоящем исследовании умеренного фармакологического синергизма бемитила и тимохинона в условиях другой экспериментальной модели гипоксической или ишемической патологии.

Фармакодинамический синергизм бемитила и тимохинона по антигипоксическому эффекту, обнаруженный в настоящем исследовании, важен для понимания возможных механизмов действия этих компонентов. Антигипоксическое действие бемитила, как полагают, обусловлено увеличением экспрессии короткоживущих возобновляемых ферментов глюконогенеза и окислительного фосфорилирования [11]. В результате активации бемитилом глюкозо-лактатного и глюкозо-аланинового циклов утилизируются азотистые продукты распада и лактат, происходит ресинтез глюкозы, повышается образование АТФ [12]. Все эти изменения способствуют выработке энергии в анаэробных условиях и повышению устойчивости клеток к гипоксии.

В качестве вероятного механизма антигипоксического действия тимохинона при ишемии-реперфузии почек называют ингибирование клеточного фактора, индуцируемого гипоксией альфа (HIF-1 α), и последующее снижение NF- κ B, факторов хемотаксиса моноцитов (CCL-2) и клеточной адгезии VCAM-1 [13]. Как полагают, в результате подавляются воспалительные и свободнорадикальные процессы при реперфузии ишемизированного органа. В других исследованиях тимохинон инициировал убиквитин-зависимую деградацию HIF-1 α протеасомами в клетках опухоли почек [14] и поджелудочной железы [15]. Вместе с тем существует мнение, что HIF-1 α является одним из основных генов, координирующих в условиях гипоксии переход к анаэробному метаболизму для производства клеточной энергии [16]. HIF-1 α индуцирует различные гликолитические ферменты и переносчики глюкозы, такие как альдолаза-A и пируваткиназа-M, которые помогают клеткам эффективно вырабатывать энергию при гипоксии. Помимо увеличения экспрессии этих ферментов, HIF-1 снижает потребление кислорода митохондриями за счет активации пируватдегидрогеназной киназы-I и остановки цикла трикарбоновых кислот. Кроме перечисленного выше, тимохинон, по литературным данным, ингибирует окислительный стресс *in vitro* и *in vivo* на различных экспериментальных моделях воспаления, цитотоксичности, атеросклероза, метаболического синдрома, подавляет NF- κ B и p53-зависимые процессы, а также повышает экспрессию супероксиддисмутазы-1, каталазы, глутатионпероксидазы-2 [6, 7].

Установленные в настоящем исследовании однонаправленное индивидуальное действие бемитила и тимохинона, выражающееся в повышении устойчивости экспериментальных животных

к гиперкапнической гипоксии, и синергизм при их совместном применении свидетельствуют о том, что исследованные антигипоксиканты имеют различные фармакодинамические мишени действия и взаимонезависимые пути трансдукции сигнала. Следует отметить, что не представляется возможным заранее предсказать результат фармакодинамического взаимодействия соединений на основе их известных или предполагаемых механизмов действия. В связи с этим перспективные комбинации необходимо изучать экспериментально с применением адекватной методологии.

Заклучение. На модели гиперкапнической гипоксии в герметичном объеме показано, что тимохинон при однократном внутривенном его введении мышам обладает выраженным антигипоксическим действием, его расчетная ED50 составляет 14,1 мг/кг. Бемитил в комбинации с тимохиноном в соотношении 5 : 1 в тех же условиях демонстрирует фармакодинамический синергизм, а эффект комбинации превышает индивидуальное действие аналогичных доз компонентов. Изучение свойств тимохинона и его комбинации с бемитилом представляет интерес для дальнейших исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Лызикив, А. Н. Лекарственные средства нового фармакологического класса – антигипоксиканты (актопротекторы): (фармакологические эффекты, результаты и перспективы применения в общемедицинской практике, военной медицине и медицине экстремальных состояний): учеб.-метод. пособие / А. Н. Лызикив, А. Э. Питкевич; под ред. Э. С. Питкевича. – Гомель: Гомел. гос. мед. ун-т, 2007. – 132 с.
2. Chou, T.-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T.-Ch. Chou // *Pharm. Rev.* – 2006. – Vol. 58, N 3. – P. 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
3. Волчек, А. В. Противовоспалительные свойства комбинации мелоксикама и N-ацетил-L-пролина / А. В. Волчек, Б. В. Дубовик // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 220–227.
4. Волчек, А. В. Анальгезирующие свойства комбинации атипичного НПВС N-ацетил L-пролина и мелоксикама на модели термической боли / А. В. Волчек, Б. В. Дубовик // *Рецепт (Recipe).* – 2014. – № 6. – С. 43–50.
5. Волчек, А. В. Анальгезирующие свойства комбинации атипичного НПВС N-ацетил L-пролина и мелоксикама на модели висцеральной боли / А. В. Волчек, Б. В. Дубовик // *Рецепт (Recipe).* – 2015. – № 1 (99). – С. 86–93.
6. Thymoquinone and its pharmacological perspective: A review / S. Tabassum [et al.] // *Pharm. Res. – Modern Chinese Medicine.* – 2021. – Vol. 1. – Art. 100020. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2021.100020>
7. Thymoquinone and its therapeutic potentials / S. Darakhshan [et al.] // *Pharm. Res.* – 2015. – Vol. 95–96. – P. 138–158. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.011>
8. Рашкевич, О. С. Антигипоксическое действие производных бензохинона в условиях гиперкапнической гипоксии / О. С. Рашкевич, А. В. Волчек // *БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: рецензир. ежегод. сб. науч. тр.: в 2 т. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т; редкол.: С. П. Рубникович, В. А. Филонюк.* – Минск, 2022. – Вып. 12. – Т. 2: Фундаментальная наука – медицине. Фармация. – С. 184–188.
9. Рашкевич, О. С. Влияние 1,4-бензохинона и тимохинона на каррагениновое воспаление у мышей / О. С. Рашкевич, А. В. Волчек // *БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: рецензир. ежегод. сб. науч. тр.: в 2 т. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: С. П. Рубникович, В. А. Филонюк.* – Минск, 2022. – Вып. 12. – Т. 2: Фундаментальная наука – медицине. Фармация. – С. 189–194.
10. Потенцирование антигипоксикантами эффекта гипоксического preconditionирования / В. Е. Новиков [и др.] // *Обзоры по клин. фармакологии и лекарств. терапии.* – 2019. – Т. 17, № 1. – С. 37–44.
11. Зарубина, И. В. Влияние бемитила на глутатионовую систему в печени крыс при острой гипоксии / И. В. Зарубина, О. П. Миронова // *Эксперим. и клин. фармакол.* – 2002. – Т. 65, № 3. – С. 28–30.
12. Oliynyk, S. The pharmacology of actoprotectors: practical application for improvement of mental and physical performance / S. Oliynyk, S.-K. Oh // *Biomol. Ther. (Seoul).* – 2012. – Vol. 20, N 5. – P. 446–456. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.5.446>
13. Thymoquinone ameliorates acute kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion / H. Ashour [et al.] // *Int. J. Morphol.* – 2021. – Vol. 39, N 2. – P. 469–476. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-9502202100020046>
14. Thymoquinone selectively kills hypoxic renal cancer cells by suppressing HIF-1 α -mediated glycolysis / Y. M. Lee [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 5, N 20. – Art. 1092. <https://doi.org/10.3390/ijms20051092>
15. Thymoquinone promotes pancreatic cancer cell death and reduction of tumor size through combined inhibition of histone deacetylation and induction of histone acetylation / D. Relles [et al.] // *Adv. Prev. Med.* – 2016. – Vol. 2016. – Art. 1407840. <https://doi.org/10.1155/2016/1407840>
16. Ziello, J. E. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia / J. E. Ziello, I. S. Jovin, Y. Huang // *Yale J. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 80, N 2. – P. 51–60.

References

1. Lyzikov A. N., Pitkevich E. S. *Medicines of a new pharmacological class – antihypoxants (actoprotectors): (pharmacological effects, results and prospects for use in general medical practice, military medicine and medicine of extreme conditions)*. Gomel, Gomel State Medical University, 2007. 132 p. (in Russian).
2. Chou T.-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 2006, vol. 58, no. 3, pp. 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
3. Volchek A. V., Dubovik B. V. Anti-inflammatory properties of the combination of N-acetyl-L-proline and meloxicam. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 2, pp. 220–227 (in Russian).
4. Volchek A. V., Dubovik B. V. Analgesic properties of the combination of an atypical NSAID N-acetyl-L-proline and meloxicam on the model of thermal pain. *Recipe*, 2014, no. 6, pp. 43–50 (in Russian).
5. Volchek A. V., Dubovik B. V. Analgesic properties of the combination of an atypical NSAID N-acetyl-L-proline and meloxicam on the model of visceral pain. *Recipe*, 2015, no. 1, vol. 99, pp. 86–93 (in Russian).
6. Tabassum S., Rosli N., Ichwan S. J. A., Mishra P. Thymoquinone and its pharmacological perspective: A review. *Pharmacological Research – Modern Chinese Medicine*, 2021, vol. 1, art. 100020. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2021.100020>
7. Darakhshan S., Bidmeshki Pour A., Hosseinzadeh Colagar A., Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Research*, 2015, vol. 95–96, pp. 138–158. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.011>
8. Rashkevich O. S., Volchek A. U. Antihypoxic effect of benzoquinone derivatives under hypercapnic hypoxia. *BGMU v avangarde medytsinskoi nauki i praktiki: retsenziruemyi ezhegodnyi sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 12. Tom 2* [BSMU at the forefront of medical science and practice: peer-reviewed annual collection of scientific papers. Iss. 12. Vol. 2]. Minsk, 2022, pp. 184–188 (in Russian).
9. Rashkevich O. S., Volchek A. U. Effect of 1,4-benzoquinone and thymoquinone on carragenine inflammation in mice. *BGMU v avangarde medytsinskoi nauki i praktiki: retsenziruemyi ezhegodnyi sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 12. Tom 2* [BSMU at the forefront of medical science and practice: peer-reviewed annual collection of scientific papers. Iss. 12. Vol. 2]. Minsk, 2022, pp. 189–194 (in Russian).
10. Novikov V. E., Levchenkova O. S., Klimkina E. I., Kulagin K. N. Potentiation of the hypoxic preconditioning effect by antihypoxants. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii = Reviews on clinical pharmacology and drug therapy*, 2019, vol. 17, no. 1, pp. 37–44 (in Russian).
11. Zarubina I. V., Mironova O. P. Effect of bemethyl on the glutathione system in the rat liver in acute hypoxia. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and clinical pharmacology], 2002, vol. 65, no. 3, pp. 28–30 (in Russian).
12. Oliynyk S., Oh S.-K. The pharmacology of actoprotectors: practical application for improvement of mental and physical performance. *Biomolecules and Therapeutics (Seoul)*, 2012, vol. 20, no. 5, pp. 446–456. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.5.446>
13. Ashour H., Rashed L., Elkordy M. A., Abdelwahed O. M. Thymoquinone ameliorates acute kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion. *International Journal of Morphology*, 2021, vol. 39, no. 2, pp. 469–476. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-9502202100020046>
14. Lee Y. M., Kim G. H., Park E. J., Oh T. I., Lee S., Kan S. Y., Kang H., Kim B. M., Kim J. H., Lim J. H. Thymoquinone selectively kills hypoxic renal cancer cells by suppressing HIF-1 α -mediated glycolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 5, no. 20, art. 1092. <https://doi.org/10.3390/ijms20051092>
15. Relles D., Chipitsyna G. I., Gong Q., Yeo C. J., Arafat H. A. Thymoquinone promotes pancreatic cancer cell death and reduction of tumor size through combined inhibition of histone deacetylation and induction of histone acetylation. *Advances in Preventive Medicine*, 2016, art. 1407840. <https://doi.org/10.1155/2016/1407840>
16. Ziello J. E., Jovin I. S., Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2007, vol. 80, no. 2, pp. 51–60.

Информация об авторах

Рашкевич Ольга Сергеевна – аспирант. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ola.rashkevich@gmail.com

Волчек Александр Владимирович – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alexwolczek@gmail.com

Information about the authors

Olga S. Rashkevich – Postgraduate student. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ola.rashkevich@gmail.com

Aliaksandr U. Vauchok – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alexwolczek@gmail.com